

**PEPTIDERKENNUNGSMECHANISMEN UND DEREN EINFLUSS AUF DIE
ENTWICKLUNG SPEZIFISCHER ENZYMEFFEKTOREN AM BEISPIEL
DER PROTEINTYROSINPHOSPHATASE SHP-1**

HABILITATIONSSCHRIFT

vorgelegt am 16. Juli 2007

der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von

Dr. rer. nat. Diana Imhof

Gutachter

1. Prof. Dr. Thorsten Heinzel
2. Prof. Dr. Frank Bordusa
3. Prof. Dr. Norbert Sewald

Erteilung der Lehrbefähigung am 27.10.2008

>> *Es wird sich zeigen, dass es gar schwierig ist, zu erkennen,
welche Eigenschaften jedes Ding in Wirklichkeit hat.* <<

DEMOKRIT

INHALT

VORWORT	I
1 SH2-DOMÄNEN ENTHALTENDE PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN	1
2 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON SHP-1 IN DER SIGNALTRANSDUKTION	3
2.1 SHP-1-Effekte in Lymphozyten	4
2.1.1 <i>Regulation der Signalweiterleitung in B-Zellen</i>	5
2.1.2 <i>Regulation der Signalweiterleitung in T-Zellen</i>	5
2.1.3 <i>Regulation der Signalweiterleitung in natürlichen Killerzellen</i>	7
2.2 SHP-1-Effekte in myeloiden Zellen	8
2.3 SHP-1-Effekte in Epithelzellen	8
2.4 Rolle von SHP-1 in der Pathophysiologie humaner Erkrankungen	10
3 MOLEKULARE BASIS DER BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN VON SHP-1	13
3.1 Expressionsmuster	13
3.2 Struktur	14
3.3 Regulation	17
3.4 Substrate der katalytischen Domäne	21
3.5 Interaktionspartner der SH2-Domänen	25
4 ENTWICKLUNG VON EFFEKTOREN FÜR PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN	29
4.1 Substratanalogie Verbindungen	29
4.2 Inhibitoren der SH2-Interaktion	32
5 STRATEGIEN ZUR MODULATION DER ENZYMAKTIVITÄT VON SHP-1	34
5.1 Beiträge zur Charakterisierung der minimalen Konsensussequenzen der N-SH2-Domäne	35
5.2 Spezifische Erkennung C-terminal der minimalen Konsensussequenzen	38
5.3 Beiträge zur Charakterisierung von SHP-1-Substraten	40
5.4 Perspektiven für die Entwicklung von Effektoren für SHP-1	43
6 ZUSAMMENFASSUNG	44
7 LITERATUR	46
ANHANG A: PUBLIKATIONEN	62

ANHANG B: ABKÜRZUNGEN	63
DANK	65
LEBENSLAUF	67
EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	68

VORWORT

Im Jahr 1819, zwanzig Jahre nach dem Fund des heute im Britischen Museum in London aufbewahrten "Steins von Rosette", gelang es dem britischen Arzt und Physiker T. YOUNG den Namen "Ptolemaios" in einer der Kartuschen zu erkennen.¹ In das Gestein ist sowohl in hieroglyphischer und demotischer Schrift als auch in griechischer Übersetzung ein Dekret der Priester von Memphis zu Ehren des Ptolemaios von Epiphanes eingraviert. Aufgrund der dreisprachigen Inschrift des Steins von Rosette konnte J. F. CHAMPOLLION 3 Jahre später nachweisen, dass die Hieroglyphenschrift eine Lautschrift ist.² Champollion's Arbeiten zur Aufklärung der Schriftsprache der Ägypter waren bahnbrechend und halfen Archäologen, zahlreiche hieroglyphische Texte lesen, übersetzen und verstehen zu können. *Sprache* wird heute im weitesten Sinne als ein "System von Zeichen zu Kommunikationszwecken" bezeichnet und tritt in den unterschiedlichsten Formen der belebten und der unbelebten Welt auf.³ In den vergangenen 30 Jahren beschäftigten sich Wissenschaftler immer mehr mit der Frage, ob Gentranskription und Proteintranslation ebenfalls Regeln der Linguistik unterliegen, da sie Informationen einer bestimmten Sequenz von Nukleinsäuren in eine andere, nämlich die der Aminosäuren, übersetzen.^{4, 5} Führt man diesen Gedanken weiter, gelangt man auf die Ebene der Proteine, die ebenfalls, wenn auch in komplexerer Art und Weise, durch ein Set linguistischer Regeln (Semantik, Grammatik, Syntax) beschrieben werden können. Gibt es demnach eine *Sprache der Proteine* und wenn ja, wie kann man diese Sprache lesen und verstehen lernen?⁶

Essentielle Beiträge zur Aufklärung des "Proteincodes" konnten und können Vergleiche von Gen- und/oder Proteinsequenzen verschiedener Spezies leisten. Die ersten Entdeckungen in diesem Gebiet halfen zu erkennen, dass Proteine in Familien und Superfamilien eingeteilt werden können, in denen individuelle Mitglieder ähnliche, aber dennoch nicht identische Aufgaben erfüllen. Nicht verwandte Proteine weisen oft eine signifikante Sequenzähnlichkeit auf. Es wurde erkannt, dass diese Regionen ähnlicher Sequenz unabhängig gefaltete Module oder Domänen darstellen, die dazu fähig sind, spezifische biochemische Reaktionen auszuführen. Die meisten funktionellen Proteine sind durch Kombination einer bestimmten Anzahl strukturell gefalteter Domänen charakterisiert. Innerhalb dieser Multidomänenproteine ist jede Domäne zu einer anonymen Funktion fähig, kann aber auch mit anderen Domänen interagieren, um ein höheres Niveau an Regulation und Kontrolle zu erlangen.

G. CESARENI *et al.* faßten diese Gedanken im Hinblick auf die Beantwortung der Frage nach einer *Sprache der Proteine* kürzlich wie folgt zusammen:

"In diesem Licht wird das humane Proteom zu einem Äquivalent eines Wörterbuches und die Aufgabe, die vor uns liegt, ist, zu lernen, wie man dieses Wörterbuch liest und die Regeln der Proteinlinguistik entschlüsselt. Dann wird es etwas einfacher, denn wir können

beginnen, die Wörter lesen zu lernen. Das wiederum bedeutet, die Domänen zu erkennen und ihre Funktionen zu verstehen. Wenn wir das einmal erreicht haben, können wir unser Verständnis über die Erkennung simpler Wörter (Domänen) hinaus zum Verständnis der biologischen Bedeutung, die hinter jedem Satz verborgen ist, erweitern."⁷

Die in neuerer Zeit angestrebte Modellierung von mono- und multizellulären Interaktionsnetzwerken,⁶ insbesondere der auf modularen Proteindomänen-Interaktionen basierenden Netzwerke, profitiert signifikant von den Erkenntnissen, die hinsichtlich der Regeln zur Definition einer Proteinfunktion akquiriert werden. Mit der Analyse von Protein-Protein-Interaktionen, in die solche Proteindomänen involviert sind, wurde somit ein neues Arbeitsfeld der Biochemie betreten, das bedeutende Resultate hinsichtlich der Aufklärung der intrazellulären Signalweiterleitung sowie der sich daraus ableitenden Forschungsansätze in der Arzneimittelentwicklung liefert.

¹Young, T., *An account of some recent discoveries in hieroglyphical literature and Egyptian antiquities*, (1823), Veröffentlicht in: Henry Tattam's *A Compendious Grammar of the Egyptian Language* (1830).

²Champollion, J. F., *Lettre à M. Dacier, relative à l'Alphabet des Hiéroglyphes phonétiques*, (27.09.1822). Veröffentlicht in : *Précis du Système Hiéroglyphique des Anciens Egyptiens*, Paris, 2 vols., (1824).

³Poole, S. C., *An introduction to linguistics*, (1999) Editor: St. Martin's Press, Scholarly and Reference Division, New York.

⁴Pesole, G., Attimonelli, M., Saccone, C., *Linguistic approaches to the analysis of sequence information*, (1994) *Trends Biotechnol.* 12, 401-408.

⁵Popov, O., Segal, D. M., Trifonov, E. N., *Linguistic complexity of protein sequences as compared to texts of human languages*, (1996) *Biosystems* 38, 65-74.

⁶Gimona, M., *Protein linguistics - a grammar for modular protein assembly*, (2006) *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 7, 68-73.

⁷Cesarini, G., Gimona, M., Sudol, M., and Yaffe, M., In: *Modular Protein Domains*, (2005) Wiley-VCH Verlag, Weinheim.

1 SH2-DOMÄNEN ENTHALTENDE PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN

Die reversible kovalente Phosphorylierung von Proteinen stellt einen kritischen Mechanismus der Regulation vielfältiger biologischer Funktionen dar. Die ubiquitäre Natur der Proteinphosphorylierung und die Tatsache, dass ca. 30% der zellulären Proteine phosphoryliert werden, unterstreichen die Bedeutung dieser posttranslationalen Modifikation für die zelluläre Signalweiterleitung, den Metabolismus, das Wachstum und die Differenzierung. Das Level der Phosphorylierung eines Proteins wird dabei im wesentlichen durch die Aktivität von zwei Klassen von Enzymen, den Proteinkinasen und den Proteinphosphatasen, bestimmt. Während Proteinkinasen (PKs) die Übertragung der Phosphatgruppe von ATP auf die Akzeptoraminosäure katalysieren, wird die Phosphatspaltung durch Proteinphosphatasen (PPs) bewirkt. Stabile Phosphatester werden hauptsächlich mit den drei Hydroxyaminosäuren Serin, Threonin und Tyrosin gebildet. Daneben spielen aber auch die mit den basischen Aminosäuren Histidin, Lysin und Arginin gebildeten labilen Phosphoramidate, gemischte Anhydride mit Aspartat- und Glutamatresten sowie Thioester mit Cystein eine Rolle.

Traditionell werden die Kinasen, die an Ser, Thr und Tyr wirken, in zwei Familien eingeteilt, den Serin/Threonin-Proteinkinasen (S/T-PKs) und den Proteintyrosinkinasen (PTKs). Die zu dieser Klassifizierung herangezogene Homologie der katalytischen Domänen ist jedoch nicht absolut, da z.B. dualspezifische PKs die Phosphorylierung aller drei Reste bewirken können. Den PTKs vergleichbar unterscheidet man auch bei den Proteinphosphatasen auf der Basis ihrer Substratspezifität in Phosphoserin/-threonin-Phosphatasen (PS/TPs) und Proteintyrosinphosphatasen (PTPs).¹

Ursprünglich wurde den PTKs eine größere Rolle als den PTPs hinsichtlich der Kontrolle der Tyrosinphosphorylierung *in vivo* zugesprochen. Jedoch stellte bereits die strukturelle Diversität der Familie der PTPs diese Annahme in Frage. Es zeigte sich schnell, dass die Feinheiten der Regulation von PTPs und die Vielfalt ihrer Funktionen mindestens denen der PTKs entsprechen.^{2, 3} Die klassischen PTP-Enzyme werden in transmembranale (Rezeptor-ähnliche) und nicht-transmembranale (zytosolische) Proteine eingeteilt. Für eine Vielzahl von zytosolischen PTPs wurde nachgewiesen, dass sie spezifisch an Rezeptortyrosinkinasen (RTKs) und andere phosphorylierte Signalproteine direkt oder indirekt assoziieren, wodurch die Mehrheit und insbesondere die Spezifität der Rezeptor-vermittelten Signalwege reguliert wird.^{3, 4}

Für zwei humane zytosolische PTPs, die SH2 (Src Homologie 2)-Domänen enthaltenden Proteine SHP-1[#] und SHP-2,^{#5} hat eine solche Assoziation die allosterische Aktivierung ihrer katalytischen Domäne zur Folge (siehe Kapitel 3.3). Durch die Interaktion mit einer Phosphorylierungsstelle und nachfolgender Aufhebung der intramolekularen Inhibierung hat die katalytische Domäne dieser beiden Enzyme einen besseren Zugang zu Rezeptor-

assoziierten Substraten. Demnach nutzen SHP-1 und SHP-2 die Rezeptor-vermittelte Phosphorylierung, um ihre eigene Dephosphorylierungsaktivität zu modulieren. Als ein typisches Beispiel für diese Regulation kann die Wechselwirkung von SHP-2 mit dem humanen PDGF β -Rezeptor genannt werden. An dessen phosphoryliertem Tyr¹⁰⁰⁹ bindet SHP-2, um anschließend Tyr⁷¹¹ des Rezeptors zu dephosphorylieren.⁴

SHP-1 und SHP-2 gehören aufgrund ihrer strukturellen Gemeinsamkeiten einer Subfamilie der PTPs an, unterscheiden sich jedoch hinsichtlich Expressionsmuster und biologischer Funktion. Im Gegensatz zur ubiquitär auftretenden SHP-2 wird SHP-1 hauptsächlich in hämatopoetischen Zellen, aber auch in epithelialen Zellen, exprimiert. Außerdem wirkt SHP-2 im wesentlichen als positiver Regulator von Signalwegen, während SHP-1 primär negativ regulatorische Funktionen hat. Beide Phosphatasen enthalten N-terminal zwei aufeinanderfolgende SH2-Domänen, eine sich daran anschließende katalytische Domäne und einen C-terminalen Teil, der zwei konservierte Tyrosinreste aufweist, die eine regulatorische Funktion besitzen (Abb. 1) (Kapitel 3.3).⁶

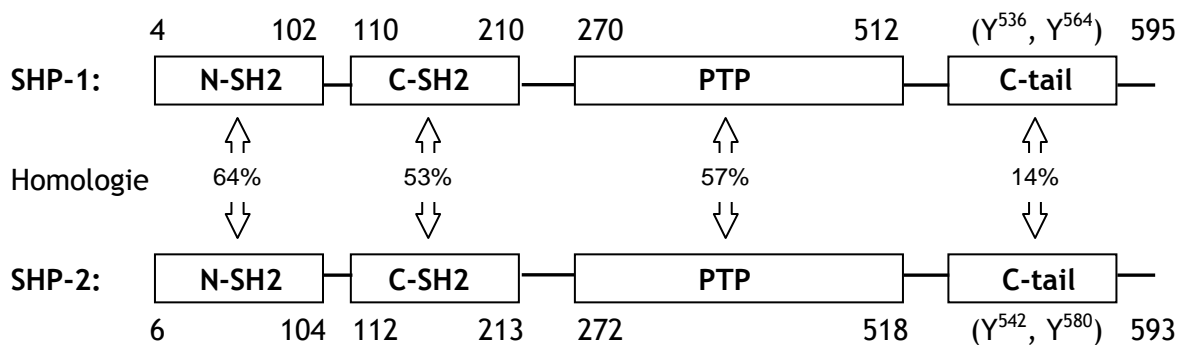


Abb. 1 Domänenstruktur von SHP-1 und SHP-2^(modifiziert aus 6)

Im Fokus der vorliegenden Arbeit steht die Modulation der Enzymaktivität von SHP-1, weshalb auf eine detaillierte Ausführung der physiologischen und pathophysiologischen Bedeutung von SHP-2 im Folgenden verzichtet wird. Dennoch ist eine strikte Trennung beider Phosphatasen aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit (Kapitel 3.2), überlappender Erkennungssequenzen ihrer SH2-Domänen (Kapitel 3.5) und sich daraus ableitender biologischer Funktionen nicht möglich. Es wurden deshalb für eine Reihe von Experimenten sowohl SHP-1 als auch SHP-2 verwendet, wie in den entsprechenden Kapiteln ausgewiesen ist.

[#]In der Literatur wurden alternativ die folgenden Bezeichnungen für SHP-1 (I) und SHP-2 (II) verwendet: (I) PTP1C, HCP, SHP, SHPTP-1, PTPN6 und (II) PTP1D, Syp, PTP2C, SHPTP-2, SHPTP-3, PTPN11.

2 FUNKTIONELLE BEDEUTUNG VON SHP-1 IN DER SIGNALTRANSDUKTION

Die Untersuchungen der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 wurden zu Beginn der 90iger Jahre insbesondere durch Ergebnisse stimuliert, die den *motheaten* (*me/me*)-Phänotyp in Mäusen mit einer 'loss-of-function' Mutation im *SHP-1* Gen in Verbindung brachten und darüberhinaus SHP-1 eine kritische Rolle in der Regulation der hämatopoetischen Zelldifferenzierung und -funktion zuwiesen (Abb. 2). Punktmutationen im Gen für SHP-1 resultieren in aberrantem Spleißen des *SHP-1*-Transkripts, wodurch entweder kein vollständiges Protein (*motheaten*, *me/me*) oder ein im Vergleich zum Wildtyp katalytisch inaktiveres (10%-25% Aktivität) Protein (*motheaten viable*, *me^v/me^v*) produziert wird.⁷



Abb. 2 Der *motheaten* Phänotyp in Mäusen (links) im Vergleich zu einer normal entwickelten, gesunden Maus (rechts). Die *me*-Mäuse sind durch verschiedene Anomalien, einschließlich progressiver Dermatitis, Nekrose der Extremitäten, Glomerulonephrose und häufig auftretender Infektionen, gekennzeichnet.⁹

Diese Störungen in der SHP-1-Expression bzw. -Aktivität resultieren in Defekten multipler hämatopoetischer Zelllinien und in Veränderungen der Entwicklung und Funktion von Lymphozyten, die sich in einer schweren kombinierten Immundefizienz (SCID) verbunden mit systemischer Autoimmunität manifestieren. Diese Entdeckungen wiederum lieferten Hinweise auf die sehr verschiedenen Rollen von SHP-1 und SHP-2, da sich der *me/me*-Phänotyp im Kontext normaler SHP-2-Expression entwickelt. Die Pathologie der *me/me*-Maus ist das Resultat einer starken Überexpansion erythropoetischer Vorläuferzellen, Granulozyten- und Makrophagenvorläuferzellen sowie CD5-positiver B-Zellen. Diese Mäuse sterben nach 2-3 Wochen (*me^v/me^v* nach ca. 9-12 Wochen) aufgrund hämorrhagischer Pneumonitis als Konsequenz einer massiven Infiltration von Granulozyten und Makrophagen in die Lunge.⁹

Proliferation, Differenzierung und funktionelle Aktivitäten hämatopoetischer Zellen werden primär durch bestimmte Proteinfaktoren, die Zytokine, reguliert. Dabei kann ein bestimmter Zytokinrezeptor nach Stimulation eine Vielzahl von Signalwegen aktivieren, und umgekehrt produzieren viele Zytokine überlappende oder sogar identische Effekte in ein- und derselben Zielzelle. Die molekulare Basis dafür kann zumindest teilweise dadurch erklärt werden, dass Rezeptoren für viele Zytokine die gleichen, für die Signaltransduktion bedeutenden Untereinheiten benutzen. Einige Zytokine fördern das Wachstum und Überleben von Vorläuferzellen und unterstützen die Entwicklung von mehr als einer Zelllinie. Beispiele dafür sind Stammzellsfaktor (SCF), Interleukin-3 (IL-3) und Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF). Im Gegensatz dazu existieren Zytokine, die primär an einer bestimmten Zelllinie wirken, wie z.B. Granulozyten Kolonie-stimulierender Faktor (G-CSF), Kolonie-stimulierender-Faktor 1 (CSF-1) und Erythropoietin (Epo), die die Expansion und Differenzierung von Granulozyten, Makrophagen und Erythrozyten fördern.¹⁰ Es wurde mehrfach gezeigt, dass SHP-1 mit einer Vielzahl von hämatopoetischen Rezeptoren (siehe auch Kapitel 2.1 und 2.2), wie z.B. B-Zellrezeptor (BCR), Epo-Rezeptor (EpoR), Interleukin 3-Rezeptor (IL-3R) und c-kit,¹³ interagiert und deren Signaltransduktion stromabwärts negativ reguliert. Im Gegensatz dazu wurde ein positiver Effekt von SHP-1 in der Fas-vermittelten Apoptose in Lymphozyten und der CSF-1-induzierten Aktivierung der MAP-Kinase in Makrophagen gefunden.^{6, 25, 26} Solche und nachfolgend aufgeführte Beispiele lieferten den Beweis, dass SHP-1 eine kritische Rolle in der Modulation der Entwicklung und Differenzierung hämatopoetischer Zellen spielt und somit die Immunantwort entscheidend beeinflusst.¹¹

2.1 SHP-1-Effekte in Lymphozyten

B- und T-Zellrezeptoren (BCR bzw. TCR) sind multimere Komplexe, die ein Erkennungsmodul (Peptid-, MHC- oder Antigenerkennung) und ein Signalmodul, das aus verschiedenen transmembranalen Proteinen (T-Zellen: CD3 γ , δ , ϵ und TCR ζ ; B-Zellen: Ig α und Ig β -Ketten) besteht, enthalten. Nach Erkennung eines Antigens durch den Rezeptor werden PTKs der Src-Familie, z.B. Lyn, Fyn und Blk in B-Zellen sowie Lck und Fyn in T-Zellen, aktiviert, was zu einer Tyrosinphosphorylierung sogenannter 'immunoreceptor tyrosine-based activation motifs' (ITAMs) [YxxLx(6-8)YxxL] führt.¹² Diese phosphorylierten ITAMs sind Andockstellen für Signaleffektoren wie die SH2-Domänen-enthaltenden PTKs Syk und ZAP-70 und dienen der Weiterleitung aktivierender Signale. Während die transmembranale Tyrosinphosphatase CD45 die Antigenrezeptorsignaltransduktion durch die Dephosphorylierung der C-terminalen inhibitorischen Phosphotyrosine von Lck und Fyn positiv beeinflusst, wurde SHP-1 als negativer Regulator der Lymphozytenaktivierung identifiziert.¹¹

2.1.1 Regulation der Signalweiterleitung in B-Zellen

Experimentelle Daten, die eine Erhöhung der Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung der MAPK sowie eine Verstärkung der proliferativen Antwort als Folge der BCR-Stimulation in *me/me*-Mäusen zeigten, dienten dabei u.a. als Nachweis für die inhibitorische Wirkung von SHP-1.¹³ SHP-1 hemmt auch die BCR-vermittelte Apoptose, die z.B. in SHP-1-defizienten B-Zellen gegenüber dem Wildtyp substantiell erhöht ist.¹³⁻¹⁶

Untersuchungen zur Aufklärung der molekularen Basis der Effekte von SHP-1 auf die BCR-Signaltransduktion zeigten, dass SHP-1 über eine Vielzahl verschiedener molekularer Interaktionen den BCR moduliert. In ruhenden B-Zellen ist SHP-1 konstitutiv an BCR assoziiert und in der Lage, die Ig α /Ig β -Ketten zu dephosphorylieren.¹³ Im Unterschied zu ruhenden Zellen liegt SHP-1 dagegen in aktivierten B-Zellen nicht im BCR-Komplex vor, sondern wird an verschiedene andere Stellen in der Zelle rekrutiert, wobei hauptsächlich inhibitorische BCR-Korezeptoren eine Rolle spielen.^{17,18} Diese Rezeptoren enthalten sogenannte 'immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs' (ITIMs) [I/L/VxpYxxL/V], die nach Phosphorylierung mit SHP-1 interagieren und dadurch ein bestimmtes Signal verstärken oder terminieren können.^{18,19} Beispiele für ITIM-enhaltende Rezeptoren in B-Zellen sind Fc γ RIIB, CD22, CD72 und PIR-B (Abb. 3). Da diese Wechselwirkungen auf der Erkennung spezifischer Phosphotyrosinreste in den ITIM-Sequenzen der Rezeptoren durch die SH2-Domänen von SHP-1 beruhen und solche Erkennungssequenzen wiederum für die Klassifizierung von SH2-Domänen-Liganden eine Rolle spielen, wird an dieser Stelle auf Kapitel 3.5 verwiesen.

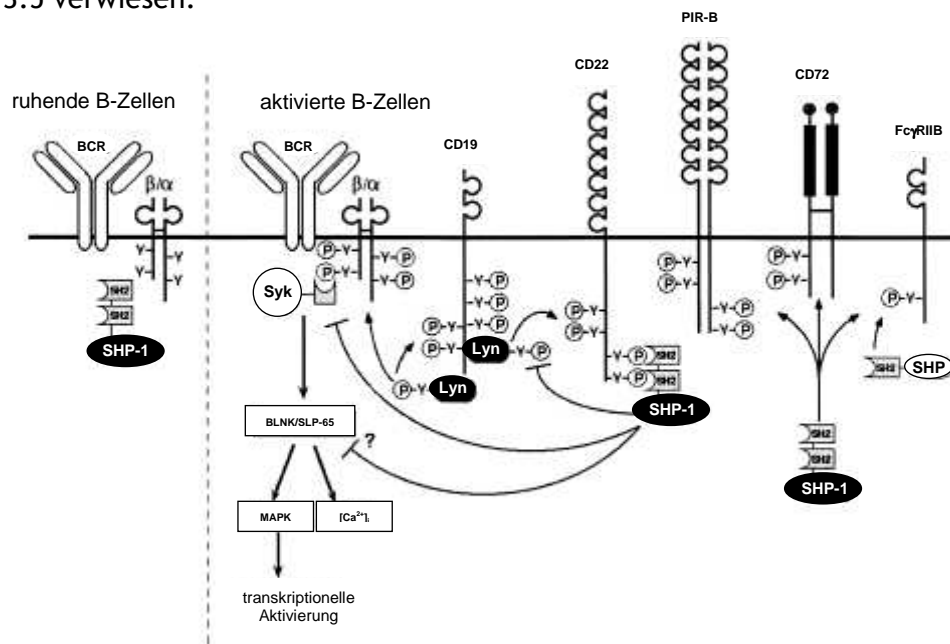


Abb. 3 Mechanismen, über die SHP-1 die durch den BCR-Komplex initiierte intrazelluläre Signalweiterleitung reguliert. (modifiziert aus 11)

2.1.2 Regulation der Signalweiterleitung in T-Zellen

Die Entwicklung verschiedener T-Zellsubpopulationen ist in *motheaten* Mäusen nahezu normal. Eine Vielzahl von Daten zeigte bezüglich der *motheaten* T-Zellfunktion jedoch auch, dass diese wie im Falle des BCR entscheidend durch die Aktivität von SHP-1 moduliert wird.²⁰ Zum Beispiel sind sowohl die proliferative Antwort als auch die IL-2-Produktion, die durch TCR-Stimulation induziert werden, in *me/me* und *me^y/me^y* relativ zu Wildtyp-T-Zellen merklich erhöht.^{21, 22} Der inhibitorische Einfluß von SHP-1 auf die TCR-Signalweiterleitung scheint ein zellanonymer Effekt zu sein, da die TCR-Empfindlichkeit auch in Thymozyten, die eine katalytisch inaktive SHP-1 exprimieren, erhöht ist. Wie in B-Zellen führen SHP-1-Effekte in T-Zellen zur Modifikation der biologischen Antwort, einschließlich der Thymozytenselektion und TCR-induzierten Apoptose.^{22, 23} Diese Daten zeigen insgesamt eine entscheidende Rolle für SHP-1 in der Regulation der TCR-Signaltransduktion, indem die Phosphatase den Schwellenwert für die TCR-vermittelte Weiterleitung aktivierender Signale anhebt, zusammen mit anderen TCR-Signalmodulatoren die Stärke des TCR-Signals modifiziert und so das biologische Ergebnis der TCR-Stimulation beeinflusst.¹¹

In Relation zur BCR-Signalweiterleitung werden die SHP-1-Effekte auf die TCR-Funktion ebenfalls durch ein Set an molekularen Interaktionen realisiert. Neben der Assoziation mit dem TCR selbst spielt auch hier die Rekrutierung der SH2-Domänen an ITIM-Motive in inhibitorischen Rezeptoren, wie z.B. KIR, Ly-49A und CD5, eine wesentliche Rolle (siehe Kapitel 3.5). Die Bindung von MHC-Klasse 1-Molekülen an KIRs, die außer in T-Zellen auch in anderen Zellen des Immunsystems exprimiert werden, führt zu einer starken Hemmung der zytosolischen Aktivität und Zytokinproduktion zytotoxischer T-Zellen.²⁷ Die Effekte von SHP-1 werden hierbei auf dem Level der Aktivierung bzw. stromabwärts der Aktivierung der Src-Kinasen Lck und Fyn²¹ sowie der Syk-Kinasen ZAP-70 und Syk^{24, 28} realisiert, die alle durch SHP-1 dephosphoryliert werden (siehe Kapitel 3.4). Im Speziellen hemmt die Assoziation von SHP-1 an KIR die Syk-vermittelte T-Zell-Zytotoxizitätsaktivität vollständig. Die SHP-1-Regulation der TCR-Signaltransduktion verbindet außerdem dessen Assoziation an KIR mit der Dephosphorylierung von SLP-76, das ein direktes Substrat für Syk und SHP-1 repräsentiert.²⁸ So wird u.a. durch das direkte Entgegenwirken der Syk-vermittelten Phosphorylierung von SLP-76 durch SHP-1 die zytotoxische T-Zellfunktion gestört.

Ein anderer Mechanismus, über den SHP-1 seine inhibitorischen Effekte auf die TCR-Signalweiterleitung ausübt, wird durch den sowohl in T-Zellen als auch in myeloiden Zellen exprimierten ITIM-enhaltenden Rezeptor PECAM-1 (platelet-endothelial cell adhesion molecule 1) vermittelt, wobei die Bindung von SHP-1 an PECAM-1 die CD3-induzierte Ca²⁺-Mobilisierung verstärkt.³⁰

Neben ITIM-enthaltenden Rezeptoren werden auch bestimmte Zytokinrezeptoren auf T-Lymphozyten direkt oder indirekt durch SHP-1 funktionell moduliert, z.B. bindet und dephosphoryliert SHP-1 die β -Kette des aktivierten IL2-Rezeptors. Diese Interaktion resultiert in einer verminderten Phosphorylierung der Rezeptor-assoziierten Janus-Kinasen JAK1 und JAK3 und könnte für die beobachtete Assoziation zwischen dem Verlust an SHP-1-Expression und dem IL-2-unabhängigen Wachstum transformierter T-Zellen verantwortlich sein. Diese Daten zeigen demnach, dass SHP-1 eine wichtige Rolle in der Downregulation der IL-2R-vermittelten aktivierenden Signale spielt und identifiziert die IL-2R-Signalweiterleitung als einen weiteren Mechanismus, über den SHP-1 die T-Zellantwort auf mitogene Stimuli hemmt.³¹

Interaktionen mit verschiedenen anderen Signaleffektoren, darunter Vav, Grb2 und Sos, die wiederum die Ras/MAPK-Aktivierung und Ca^{2+} -Freisetzung modulieren, wurden ebenfalls für SHP-1 beschrieben.²⁹

2.1.3 Regulation der Signalweiterleitung in natürlichen Killerzellen

Einer der wichtigsten aktivierenden Signalwege in natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) wird durch die Bindung an Fc-Rezeptoren (FcRs) und nachfolgender Aktivierung der PTKs Lck, ZAP-70 und Syk sowie stimulierender Signaleffektoren wie $\text{PLC}\gamma$, die das Signal stromabwärts weiterleiten, initiiert.^{32, 33} Die aktivierenden Signale werden auch hier durch ITIM-enthaltende inhibitorische Rezeptoren, einschließlich KIR, gp49B, LTR-1/ILT-2R und CD94/NKG2, über die Assoziation mit SHP-1 negativ reguliert.³⁴⁻³⁸ Zum Beispiel führt die Aktivierung von KIR durch Interaktion mit einem MHC-Klasse I-Protein zur Tyrosinphosphorylierung seiner ITIM-Sequenz und nachfolgender Rekrutierung von SHP-1 an den Rezeptor, was schließlich in einer konsequenten Hemmung der Lyse der Zielzelle resultiert.^{34, 35} Obwohl die Mechanismen der Hemmung der zytolytischen Aktivität der NK-Zellen durch SHP-1 noch nicht vollständig aufgeklärt sind, konnten dennoch einige Signaleffektoren, die durch SHP-1 dephosphoryliert werden, nachgewiesen werden. Dazu zählen wie auch in T-Zellen die Proteine ZAP-70, $\text{PLC}\gamma$,³⁴ Syk³⁹ und SLP-76.²⁸

2.2 SHP-1-Effekte in myeloiden Zellen

Die Zellen der myeloiden Linie (Monozyten, Makrophagen, Granulozyten, Thrombozyten, Erythrozyten) können durch Interaktionen mit chemotaktischen Peptiden, Zytokinen und einer Vielzahl anderer Liganden aktiviert werden, was letztlich über verschiedene Signalkaskaden zu Proliferation, Chemotaxis, Adhäsion, Phagozytose und Sekretion von granularen Vesikeln führt.⁴⁰⁻⁴³

Eine kritische Rolle hinsichtlich der Regulation dieser Signalwege besitzen dabei erneut PTPs, was z.B. anhand der schweren Entzündungen, die SHP-1-defiziente *motheaten* Mäuse aufweisen, demonstriert werden kann. SHP-1 ist hier ebenfalls an der Unterdrückung der Signalkaskaden, die das myeloide Wachstum, das Überleben und die Aktivierung fördern, beteiligt. Außerdem scheint SHP-1 die adhesiven Eigenschaften von myeloiden Zellen zu regulieren, da die β 2-Integrin-vermittelte Adhäsion sowohl in Makrophagen aus *me/me*-Mäusen als auch in einer SHP-1-defizienten myelomonozytischen Zelllinie erhöht sind.^{44, 45}

Wie bereits für Lymphozyten in Kapitel 2.1 gezeigt, werden auch in myeloiden Zellen die Effekte von SHP-1 durch die Interaktion mit einem breiten Spektrum von Signaleffektoren, darunter Rezeptoren für Wachstumsfaktoren wie c-kit,⁴⁶ Granulozyten/Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF),⁴⁷ Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF oder CSF-1),⁴⁸ und Interleukin-3 (IL-3),⁴⁹ vermittelt. Im Kontext der SHP-1-Defizienz in *motheaten* Mäusen sind sowohl M-CSF-1R als auch IL-3R nach Stimulation hyperphosphoryliert.^{47-49, 61} Demnach ist SHP-1 in der Lage, die durch diese Rezeptoren transduzierten aktivierenden Signale durch direkte Dephosphorylierung bestimmter Rezeptorkomponenten^{46, 50} bzw. indirekt durch die Regulation von JAK-Kinasen⁵¹ negativ zu beeinflussen. Auch ITIM-enhaltende inhibitorische Rezeptoren sind zum Teil an der Vermittlung der Effekte von SHP-1 auf die Physiologie myeloider Zellen beteiligt (siehe Kapitel 3.5).⁵² Beispiele dafür sind der auf Makrophagen und Mastzellen exprimierte PIR-B⁵³ oder auch zwei MHC-Klasse I-Moleküle bindende Rezeptoren, die auf Monozyten präsent sind, LIR-1 und LIR-2.⁵⁴ Letztere wurden als Inhibitoren der Fc γ RI-vermittelten Monozyten-Aktivierung identifiziert. Analog dazu wird die Signalweiterleitung des Fc-Rezeptors für IgE (Fc ϵ RI) in Mastzellen durch einen weiteren SHP-1-bindenden Rezeptor, gp49B, negativ moduliert. Nach Koligation von gp49B mit Fc ϵ RI werden die Fc ϵ RI-vermittelte Exozytose und der intrazelluläre Ca²⁺-Einfluß gehemmt.^{38, 55, 56} In Makrophagen spielt außerdem der zwei ITIM-Motive enthaltende SHPS-1 (SIRP α 1, BIT, p84) eine Rolle hinsichtlich der Rekrutierung von SHP-1.⁵⁷⁻⁵⁹ SHPS-1 ist an der Integrin-vermittelten Adhäsion von Makrophagen beteiligt und bindet SHP-1 ebenfalls nach Tyrosinphosphorylierung der ITIM-Sequenzen. Zusätzlich konnte eine Assoziation von SHPS-1 mit dem CSF-1R gezeigt werden,⁵² was auf eine Netzwerkbildung zur Rekrutierung von SHP-1 an verschiedene Rezeptoren hinweist. SHPS-1 ist demnach an der Bildung eines multimeren Proteinkomplexes beteiligt, der die Adhäsion reguliert, und die Rekrutierung von SHP-1 an diesen Komplex ist die Basis für die Downregulation der Integrin-vermittelten Signaltransduktion.^{58, 60}

2.3 SHP-1-Effekte in Epithelzellen

Im Unterschied zu hämatopoetischen Zellen ist der Gehalt an SHP-1 in epithelialen Zellen geringer. Desweiteren wird in diesen Zellen eine N-terminal veränderte Variante von SHP-1 ((I)SHP-1) exprimiert (siehe Kapitel 3.1).^{62, 63} In den vergangenen 10 Jahren konnten, wenn auch im Vergleich zu hämatopoetischen Zellen in geringerer Anzahl, verschiedene Interaktionspartner von SHP-1 in epithelialen Zellen identifiziert werden.

So konnte u.a. gezeigt werden, dass SHP-1 mit dem autophosphorylierten EGF-Rezeptor in humanen epithelialen Tumorzellen assoziiert. Die Dephosphorylierung des EGFR durch SHP-1 konnte dabei durch Behandlung des Rezeptor-PTP-Komplexes mit Phosphatidsäure initiiert werden.⁶⁴ In einer späteren Arbeit konnten die Strukturelemente in SHP-1, die für diese Assoziation verantwortlich sind, aufgeklärt werden.⁶⁵ Eine Punktmutation in der N-terminalen SH2-Domäne führte zu einer signifikant reduzierten Assoziation, während eine ebenfalls durch Punktmutation veränderte C-SH2-Domäne die Assoziation nur geringfügig negativ beeinflusste. Wurden jedoch beide SH2-Domänen mutiert, blieb die Assoziation komplett aus.⁶⁵

Verschiedene Befunde, z.B. die Sterilität männlicher *me^v/me^v* Mäuse, eine Korrelation von Defekten in der Spermienreifung dieser Mäuse mit einer gestörten Differenzierung der Epididymis und Ähnlichkeiten mit einem Phänotyp, in dem eine gezielte Inaktivierung der Rezeptortyrosinkinase Ros gefunden wurde, führten zu Untersuchungen der molekularen Basis dieser Erscheinungen. In deren Ergebnis konnte die Wechselwirkung von SHP-1 mit Ros nachgewiesen werden. In *me^v/me^v* Mäusen liegt Ros hyperphosphoryliert vor. Es wurde gezeigt, dass SHP-1 über seine SH2-Domänen effizient an Ros assoziiert, andererseits aber auch bestimmte phosphorylierte Tyrosinreste in der Aktivierungsschleife der Tyrosinkinase Substrate der katalytischen Domäne von SHP-1 darstellen. In diesem Zusammenhang wurde vorgeschlagen, dass SHP-1 ein negativer Regulator der durch Ros initiierten Signalweiterleitung ist.⁶⁶ Entscheidende Ausgangspunkte unserer Arbeiten stellten sowohl die SHP-1 (N-SH2)-Ros-Interaktion als auch die Dephosphorylierung von Ros durch SHP-1 dar, weshalb an dieser Stelle auf die entsprechenden Kapitel verwiesen werden soll (Kapitel 5.1, 5.3).

2.4 Rolle von SHP-1 in der Pathophysiologie humaner Erkrankungen

Die Tatsache, dass Mutationen im *SHP-1* Gen in multiplen hämatopoetischen Anomalien resultieren, lies den Schluß zu, dass eine gestörte Expression und/oder Aktivität der Phosphatase die molekulare Ursache von Erkrankungen sind, die mit Hämatopoese und Myelopoese im Zusammenhang stehen. Einen ersten Hinweis auf eine Beziehung zwischen SHP-1 und einer dieser Krankheiten, dem sogenannten Kostmann's Syndrom, lieferten TIDOW *et al.* 1999.⁶⁷ Bei dieser erblichen, oft tödlich verlaufenden infantilen Agranulozytose ist die Differenzierung der myeloiden Vorläuferzellen im myelozytischen oder promyelozytischen Stadium gehemmt. Neutrophile von Patienten mit Kostmann's Syndrom weisen eine erhöhte Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von JAK2 auf, weshalb der Einfluß von PTPs auf die intrazelluläre Signalweiterleitung genauer untersucht wurde. Es konnte gezeigt werden, dass SHP-1 in diesen Neutrophilen im Vergleich zu denen gesunder Probanden überexprimiert ist und auch eine erhöhte Phosphataseaktivität vorliegt. Beide Sachverhalte wurden mit Störungen in der Dephosphorylierung von an intrazellulären Signalwegen beteiligten Proteinen in Verbindung gebracht. Patienten mit Kostmann's Syndrom weisen außerdem auch Mutationen im *G-CSF* Gen auf, die in einer Verkürzung der C-terminalen Region des G-CSF-Rezeptors resultieren.⁶⁸ Folge dessen ist eine verstärkte Aktivierung von STAT-Transkriptionsfaktoren (STAT3 und STAT5), die hinsichtlich der Induktion der Zellproliferation hyperaktiv sind, wohingegen die Differenzierung gestört ist. SHP-1 spielt eine negativ regulatorische Rolle in der G-CSF-induzierten STAT-Aktivierung und im Zusammenhang mit Patienten des Kostmann's Syndroms wurde gezeigt, dass der C-Terminus des Rezeptors für die Downregulation der STAT-Aktivierung durch SHP-1 erforderlich ist. Diese Regulation ist hochspezifisch, da SHP-1 keinen Effekt auf die durch G-CSF-ausgelöste Aktivierung von Akt und ERK1/2 hatte.⁶⁸

Eine Veränderung des *SHP-1* Gens bzw. der Expression des Proteins wird auch häufig in Krebszellen gefunden.⁷¹⁻⁷⁹ Hypermethylierung von normalerweise unmethylierten CpG-Inseln von Tumorsuppressorgenen wird mit transkriptionellem Silencing assoziiert und deshalb als kritisch für die Krebsentwicklung und -progression angesehen.^{69, 70} Sehr häufig wird dieses durch aberrante Promotermethylierung ausgelöste zellspezifische Silencing des *SHP-1* Gens in verschiedenen Formen von Leukämie,⁷¹⁻⁷³ u.a. der akuten myeloischen Leukämie (AML),⁷³ in Lymphomen,^{71, 72, 74-77} und Myelomen⁷⁸ gefunden.

Im Zusammenspiel mit dem G-Protein gekoppelten Rezeptorsubtyp 2 (SSTR2) des Peptidhormons Somatostatin (SST) konnte wiederum eine antiproliferative Wirkung von SHP-1 in verschiedenen normalen und malignen Zellen, wie z.B. Lymphom-, Myelom-, Brust-, Prostata-, Pankreas- und Dickdarmkrebszellen, nachgewiesen werden.⁸⁰⁻⁸⁶ In Abhängigkeit vom Zelltyp wurden dafür jedoch unterschiedliche Signalwege vorgeschlagen, wie in den Abbildungen 4 und 5 dargestellt ist.

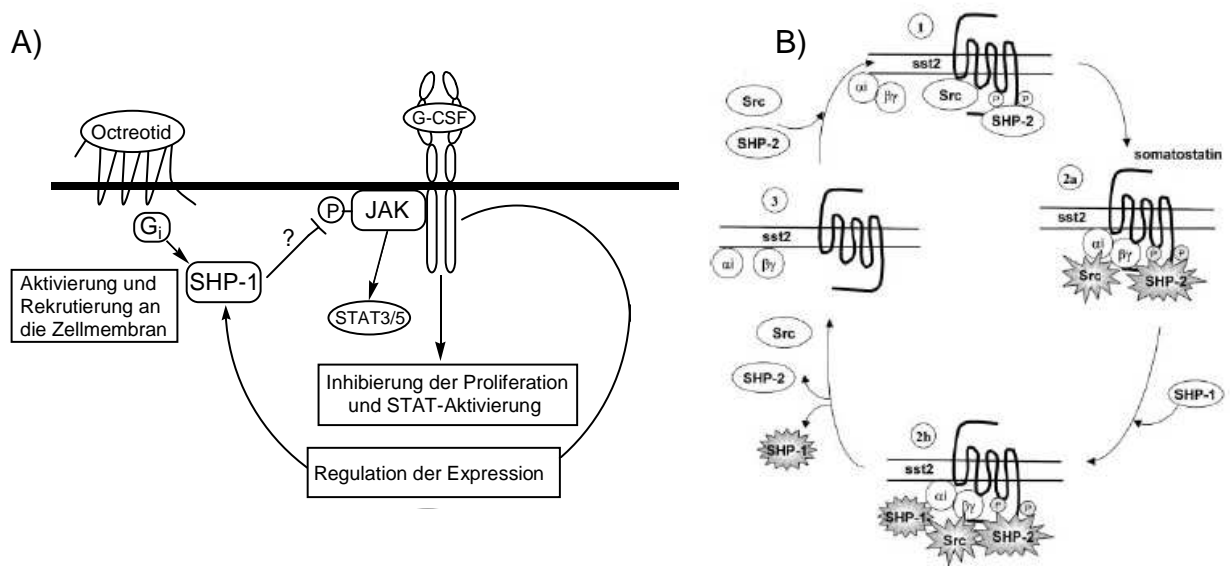


Abb. 4 Vorgeschlagene Modelle, über die Somatostatin im Zusammenspiel mit SHP-1 seine antiproliferative Wirkung ausgehend vom Rezeptorsubtyp 2 ausübt.^{80, 83}
 *Bei Octreotid handelt es sich um ein peptidisches Somatostatinanalogon.

Zum Beispiel hemmt SST die G-CSF-induzierte Proliferation in AML-Zellen über die Aktivierung von SHP-1 und nachfolgende Hemmung der Aktivierung von STAT3 und STAT5 (Abb. 4A).⁸⁰ In einer anderen Arbeit konnte gezeigt werden, dass der Aktivierung und Wirkung von SHP-1 die Rekrutierung von SHP-2 und Src an ITIM-Sequenzen des SSTR2 vorangeht (Abb. 4B). Der SSTR2 enthält zwei ITIM-Sequenzen, das Motiv LCY²²⁸LFI in der dritten intrazellulären Schleife und ILY³¹²AFL im C-terminalen Teil, an die SHP-2 zunächst assoziiert und dadurch aktiviert wird. Auch Src ist an den Rezeptor assoziiert und wird durch einen $G\beta\gamma$ -abhängigen Mechanismus aktiviert, bevor SHP-1 rekrutiert und aktiviert wird. Nach Dephosphorylierung des Rezeptors dissoziiert der Multiproteinkomplex, wobei die aktivierte Phosphatase SHP-1 durch Dephosphorylierung von Signaleffektoren den inhibitorischen Effekt von SST auf die Proliferation ausübt.⁸³ Letzteres wurde in einem anderen Modell von LAHLOU *et al.*, die den inhibitorischen Effekt von SST mit einer Hemmung des ERK-Signalweges in Verbindung brachten, erneut beschrieben (Abb. 5). Dabei erfolgt über die Ausbildung eines Multiproteinkomplexes (SSTR2- $G_{i/o}$ /SHP-1/SHP-2/PI3K/Src) nach Stimulation des Rezeptors die Aktivierung der kleinen GTP-bindenden Proteine Ras und Rap1, die wiederum die MEK Kinase B-Raf und letztlich ERK1/2 aktivieren. Die ERK1/2-Aktivierung führt zur Induktion des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p27^{Kip1}, wodurch die Kinase Cyclin E-cdk2 gehemmt wird, hypophosphoryliertes p105Rb akkumuliert und schließlich Zellzyklusarrest eintritt.⁸⁴

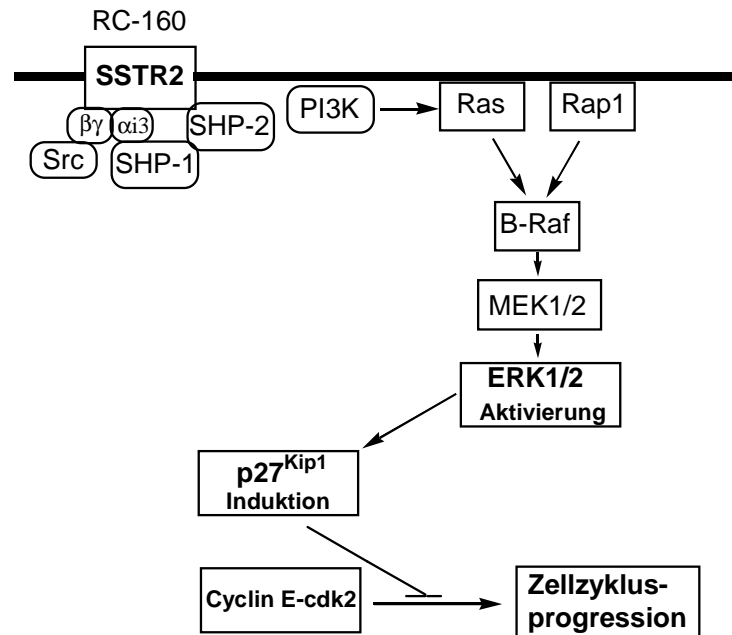


Abb. 5 Vorgeschlagenes Modell für die RC-160^{*}-vermittelte, ERK1/2-abhängige Inhibition des Zellwachstums in SSTR2-überexprimierten CHO-Zellen.⁸⁴
^{*}Bei RC-160 handelt es sich um ein peptidisches Somatostatinanalogon.

Neben den bereits erwähnten Funktionen von SHP-1 wurde außerdem bei einer Gruppe von Infektionskrankheiten, die durch verschiedene Arten von Flagellaten der Gattung *Leishmania* hervorgerufen werden, ein Zusammenhang zwischen der Induktion der Makrophagen-Deaktivierung und der Aktivierung von SHP-1 gefunden.⁸⁷⁻⁹⁰ *Leishmania* sind intrazelluläre Parasiten der Monozyten und Makrophagen, die verschiedene Strategien entwickelt haben, um ihrer Eliminierung durch angeborene und erworbene Immunmechanismen entgegenzuwirken. Eine dieser Strategien involviert die Manipulation der regulatorischen Signalwege der Wirtszelle, um so beispielsweise die für die mikrobizide Aktivität erforderliche Makrophagenaktivierung zu verhindern.⁸⁹ Es konnte gezeigt werden, dass der *Leishmania* Elongationsfaktor-1α (EF-1α) ein Bindeprotein von SHP-1 ist und dass die durch ihn induzierte SHP-1-Aktivität für das Überleben und die Vermehrung der Einzeller in den Phagozyten notwendig ist.^{88, 89} In *me^v/me^v* Mäusen wurde außerdem gefunden, dass die Antwort auf *Leishmania*-Infektionen im Vergleich zu Kontrolltieren verstärkt ist, was sich in einer erhöhten Expression und Sekretion proinflammatorischer Zytokine (TNF-α, IL-1β und IL-6) sowie einer ebenfalls erhöhten Chemokin- und Chemokinrezeptorexpression resultiert, wobei Letzteres durch SHP-1 reguliert wird. Die Fähigkeit von *Leishmania*, die Aktivität von SHP-1 in der Wirtszelle zu induzieren, erlaubt somit die Einschränkung einer sonst starken angeborenen inflammatorischen Antwort, die schädlich für das Überleben und die Vermehrung der Parasiten wäre.⁹⁰

3 MOLEKULARE BASIS DER BIOLOGISCHEN FUNKTIONEN VON SHP-1

In ersten Untersuchungen zur Charakterisierung der enzymatischen Aktivität von SHP-1 (EC 3.1.3.48) gegenüber phosphorylierten Substraten wie z.B. *p*-Nitrophenylphosphat (pNPP) und Phosphotyrosin (pY) zeigte sich eine starke Abhängigkeit von pH-Wert (pH-Optimum für das full-length Enzym: 5,5) und Ionenstärke (NaCl-Optimum: 250-300 mM). Das Enzym bindet kleine organische Substrate (pNPP) nur mit sehr geringer Affinität ($K_m = 148 \text{ mM}$), außerdem deutete die niedrige Spezifitätskonstante k_{cat}/K_m von $1,0 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ auf eine ineffiziente Substratumsetzung hin.⁹¹ Die translatierte Sequenz der cDNA von SHP-1 ergab ein Protein mit konservierter Domänenstruktur, wobei am N-Terminus zwei SH2-Domänen identifiziert wurden (vgl. auch Abb. 1). Die Tatsache, dass sich die C-terminale katalytische Domäne in ihren Eigenschaften hinsichtlich Substratbindung und -umsetzung vom full-length Enzym signifikant unterscheidet, ließ den Schluß zu, dass die Phosphatase durch ihre SH2-Domänen intramolekular reguliert ist.^{92-94, 100} In den nach-folgenden Unterpunkten (3.1-3.5) sind die zur Entwicklung von Liganden der SHP-1 SH2-Domänen essentiellen literaturbekannten Fakten zur Expression, Struktur und Regulation der Phosphatase als grundlegende Voraussetzung für unsere Arbeiten zusammengefaßt.

3.1 Expressionsmuster

SHP-1 wird in allen hämatopoetischen Zellen, in bestimmten epithelialen Zellen und in Astrozyten und Oligodendrozyten des ZNS in verschiedenen Konzentrationen exprimiert.^{62, 95-97} Das *SHP-1* Gen im menschlichen Genom ist auf Chromosom 12 (12p12-p13) lokalisiert und besteht aus 17 Exons. Im Menschen und der Maus wurden 2 *SHP-1*-Transkripte, die als (I)SHP-1 und (II)SHP-1 bezeichnet wurden, identifiziert. Die cDNA-Sequenzen beider Transkripte sind in diesen Spezies mit Ausnahme der 5'-untranslatierten Regionen und der initialen kodierenden Nukleotide identisch.^{9b, 63, 94, 98} Das 597 Aminosäuren umfassende (I)SHP-1-Transkript beginnt mit der Sequenz MLSRG, wohingegen MVR die ersten drei Aminosäuren der (II)SHP-1-Form darstellen, die insgesamt 595 Aminosäuren umfaßt.^{63, 98} Zwei Promoter dirigieren die Expression der humanen SHP-1. Die (I)SHP-1- und (II)SHP-1-Transkripte werden vom distalen bzw. proximalen Promoter initiiert. Die Promoterverwendung in hämatopoetischen Zellen ist anders als die in epithelialen Zellen. In epithelialen Zellen wird nur das (I)SHP-1-Transkript exprimiert, wobei SHP-1-Proteine dieses Transkriptes im Kern lokalisiert sind. Diese können demnach unterschiedliche Signalsubstrate im Vergleich zu den zytosolischen (II)SHP-1-abgeleiteten Proteinen, die in hämatopoetischen und epithelialen Zellen auftreten, besitzen.^{9b} Beide SHP-1-Varianten sind in ihrer katalytischen Aktivität vergleichbar.⁹⁹

3.2 Struktur

Die beiden SHPs bestehen aus drei kompakten Domänen, zwei SH2-Domänen (N-SH2, C-SH2) und einer katalytischen (PTP) Domäne. Zunächst konnte die Analyse der Kristallstruktur der homologen SHP-2 (ca. 60% Sequenzidentität) zeigen, in welcher Art die Aktivität der PTP-Domäne durch die SH2-Domänen reguliert wird (Abb. 1 und 6). Die Kristallstrukturanalysen der full-length Enzyme zeigen eine 'geschlossene' Konformation, in der die beiden SH2-Domänen um die PTP-Domäne angeordnet sind, wobei es eine direkte Assoziation zwischen der N-SH2- und der PTP-Domäne gibt. Dabei verändert die Wechselwirkung der N-terminalen SH2-Domäne mit der PTP-Domäne die Struktur des Enzyms so, dass die Substratbindungsfurche des aktiven Zentrums blockiert ist. Deshalb stellt die N-SH2-Domäne einen konformationellen Schalter dar, der entweder die PTP-Domäne bindet und somit die Phosphatase inhibiert bzw. der einen Phosphotyrosin-enhaltenden Liganden bindet und damit das Enzym aktiviert.^{101, 102} Im nativen Zustand sind SHP-1 und SHP-2 demnach aufgrund des autoinhibitorischen Einflusses der N-SH2-Domäne katalytisch inaktiv. Die Interaktion der N-SH2-Domäne mit der PTP-Domäne ist dabei im Gegensatz zu den Tyrosinkinasen der Src-Familie Phosphotyrosin-unabhängig.⁶

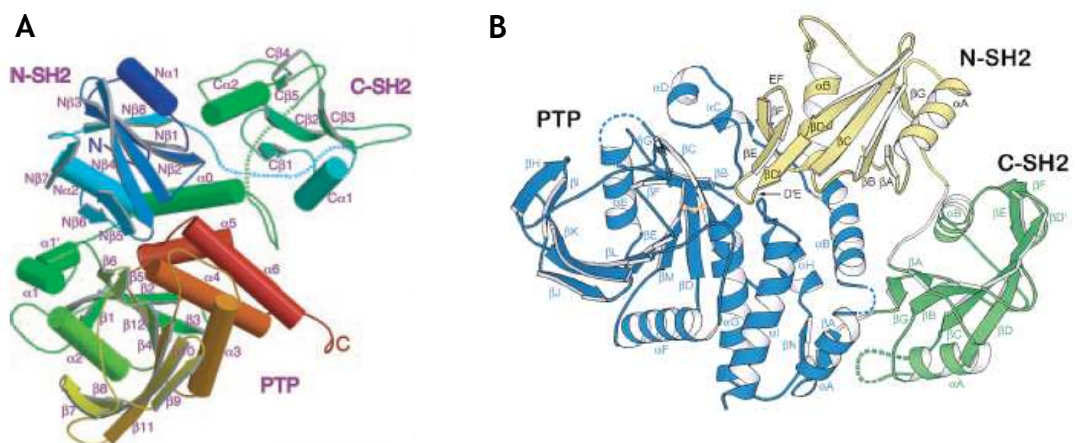


Abb. 6 Ribbon-Darstellung der Kristallstrukturen von SHP-1 (A)¹⁰² und SHP-2 (B)¹⁰¹

Im Fall von SHP-1 umfaßt die N-SH2-Domäne in der Kristallstruktur die Reste 1-108 und die C-SH2-Domäne die Reste 116-208. Die katalytische PTP-Domäne schließt die Aminosäure-positionen 270-532 ein. Die PTP-Domäne wird aus einem hochgradig verdrillten 10-strängigen β -Faltblatt gebildet, das durch vier Helices auf der konvexen und zwei Helices auf der konkaven Seite flankiert wird. Die Linkerregionen zwischen C-SH2- und N-SH2-Domäne (Reste 109-115) sowie zwischen C-SH2- und PTP-Domäne (209-231) sind ungeordnet und konnten deshalb nicht definiert werden. Die Struktur der PTP-Domäne der Ligand-freien SHP-1 ist der der Peptid-gebundenen (SIRP α pY⁴⁶⁹: EDTLTpYADLD) Struktur der Phosphatasedomäne nahezu identisch.^{102, 103}

Starke Unterschiede gibt es dennoch vor allem im Bereich der $\beta 5$ - $\beta 6$ -Haarnadelloopstruktur (Reste 356-363) (Abb. 7B). Die Flexibilität dieser Region wird als essentiell für die Substraterkennung diskutiert.^{102, 104, 105} Eine erhöhte Flexibilität zeigt sich auch um die Phosphopeptidbindungsstelle anderer Loops, wie z.B. $\alpha 1$ - $\beta 1$, $\beta 3$ - $\alpha 2$ und $\alpha 0$ - $\alpha 1$ (Abb. 7B). Der Helix $\alpha 0$ wird ebenfalls eine Rolle in der Substraterkennung zugesprochen. Das katalytische Nucleophil Cys⁴⁵⁵ ist dagegen auf dem Grund der Furche, die das aktive Zentrum bildet, lokalisiert.

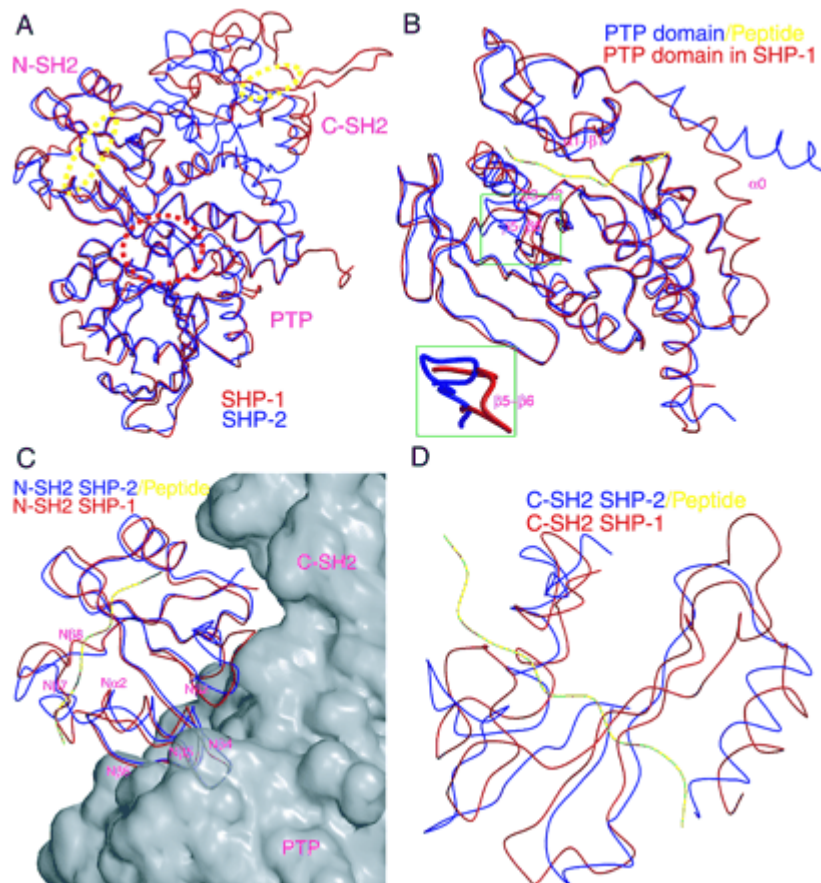


Abb. 7 Superpositionierung von SHP-1 und SHP-2: (A) full-length Enzyme, (B) PTP-Domänen, (C) N-SH2-Domänen und (D) C-SH2-Domänen¹⁰²

Die SHP-1 SH2-Domänen weisen die typische SH2-Domänen-Faltung bestehend aus einem zentralen 4-strängigen β -Faltblatt, das an jeder Seite durch eine α -Helix flankiert wird, auf.^{102, 106} SH2-Domänen erkennen pY-enhaltende Proteine und erlauben Phosphorylierungsabhängige Protein-Protein-Interaktionen, die die Signalweiterleitung ermöglichen. Die Phosphopeptidbindungsstellen der beiden SHP-1 SH2-Domänen sind von der PTP-Domäne entfernt, auf der Oberfläche des Moleküls angeordnet. Die räumliche Anordnung der beiden SH2-Domänen auf der PTP-Domäne sowie die Funktion beider Domänen bezüglich der Aktivität des Enzyms unterscheiden sich jedoch signifikant. So ist die N-SH2-Domäne ausschließlich für die Autoinhibition der Phosphatase im nativen Zustand verantwortlich. Die Interaktionen zwischen N-SH2- und PTP-Domäne sind sehr intensiv, während die C-SH2-

Domäne keine ausgeprägte Kontaktfläche mit beiden Domänen besitzt. In der autoinhibierten Konformation scheint es, dass der N β 4-N β 5-Loop der N-SH2-Domäne in Richtung der PTP-Domäne herausragt und so den Eingang zum aktiven Zentrum direkt blockiert (Abb. 7C). Die inaktive Konformation wird durch Salzbrücken zwischen Asp⁶¹ und Lys³⁶², π - π -Interaktionen zwischen Phe⁶² und Tyr²⁷⁸ sowie Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Paaren Ser⁵⁹/His⁴²², Gly⁶⁰/Gln⁵⁰⁶ und Asn⁵⁸/Gln⁵⁰² stabilisiert. Diese Reste sind in SHP-1 und SHP-2 mit Ausnahme des Ser⁵⁹ (Thr in SHP-2) konserviert. Die Kontaktfläche zwischen SHP-1 N-SH2- und PTP-Domäne umfaßt ca. 1478,9 Å und ist damit 20% größer als in SHP-2.¹⁰² Molecular Dynamics Simulationen an SHP-2 zeigten auch, dass die konformationelle Flexibilität der C-terminalen Hälfte der N-SH2-Domäne, die mit der PTP-Domäne interagiert, bei Abwesenheit des Liganden größer ist als in der Ligand-komplexierten Form.¹⁰⁷ Die größte Übereinstimmung zwischen SHP-1 und SHP-2 ist in den PTP- und N-SH2-Domänen zu finden (Abb. 7B und 7C).¹⁰²

Die C-SH2-Domäne ist in beiden SHPs verschieden orientiert, und in SHP-1 sind die C-SH2-Sekundärstrukturelemente zusätzlich offener organisiert (Abb. 7D), so dass die pY-Bindungstasche dieser Domäne einer weitreichenden Rotation unterliegt. Obwohl die N-SH2-Domäne eine kritischere Rolle für die Signalweiterleitung besitzt als die C-SH2-Domäne, ist Letztere dennoch unabdingbar für ein optimales Signalling. YANG et al. schlugen vor, dass die C-SH2 eine Art Antennenfunktion auf der Suche nach Enzymaktivatoren inne hat, woraus sich der in Abbildung 8 dargestellte Aktivierungsmechanismus ergibt.¹⁰² Diese Hypothese wird auch durch Beobachtungen unterstützt, wonach eine um die C-SH2-Domäne verkürzte SHP-1 zu einem geringeren Ausmaß aktiviert wird als das full-length Enzym.⁹¹⁻⁹³

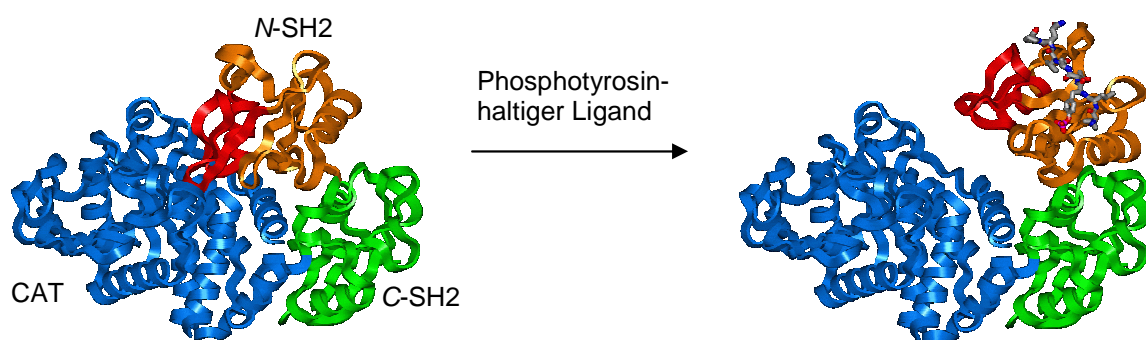


Abb. 8 Allosterische Regulation der katalytischen Aktivität der PTPs SHP-1 und SHP-2

Es ist bisher unklar, ob der C-tail in die Faltung von SHP-1 und SHP-2 involviert ist, da in den Kristallstrukturanalysen die C-terminalen Aminosäuren (61 bei SHP-1 und 66 bei SHP-2) fehlen.

3.3 Regulation

Autoinhibitorische Elemente wie die N-SH2-Domäne und der C-terminale Teil der Phosphatase sind vorrangig für die Regulation der enzymatischen Aktivität von SHP-1 von Bedeutung. Nach YANG *et al.* muß SHP-1 aus einer geschlossenen bzw. halb-offenen Konformation in eine offene Konformation wechseln, bevor Substrate an das aktive Zentrum binden können (Kapitel 3.4).¹⁰⁴ Verschiedene Gruppen haben gezeigt, dass N- und C-terminale Verkürzungen von SHP-1 dessen katalytische Aktivität um das 20-40-fache erhöhen.^{92, 108} Deshalb wurden folgende Hypothesen hinsichtlich der Regulation von SHP-1 aufgestellt:

- I. Der C-terminale Teil enthält 2 Regionen, wobei eine, die 50 N-terminalen Aminosäuren des C-Terminus, für die Aktivierung von SHP-1 kritisch ist.
- II. Die N-SH2-Domäne reguliert SHP-1 durch Wechselwirkungen mit der PTP-Domäne.
- III. Die SHP-1-Aktivität ist pH-abhängig, da das intakte Enzym bei pH 7,4 inaktiv, jedoch bei pH 5,4 aktiv ist.

Nachweise für Hypothese I.

A) Phosphorylierung C-terminaler Aminosäuren

Es wurde vielfach gezeigt, dass SHP-1 nach Stimulation bestimmter Zellen durch verschiedene Kinaseaktivitäten phosphoryliert werden kann. Die Phosphorylierungsstellen liegen dabei hauptsächlich im C-Terminus des Enzyms. LORENZ *et al.* konnten nachweisen, dass SHP-1 in T-Hybridomazellen ein Substrat der Tyrosinkinase Lck (Konsensussequenz EE(I/E/V)Y(E/G)(E/D/P/N)(I/V/L)) ist, wobei die Sequenz um Tyr⁵⁶⁴ (EDVYENL) phosphoryliert wird, während Tyr⁵³⁶ (ESEYGNL) hier als Andockstelle für das Protein Grb2 vorgeschlagen wurde.¹⁰⁹ *In vitro* Experimente zur Phosphorylierung von SHP-1 mit cAMP-abhängiger Proteinkinase und PKC α ergaben, dass diese SHP-1 an Ser⁵⁹¹ phosphorylieren, während BIRK und EGFR an Tyr⁵³⁸ phosphorylieren.¹¹⁰ Die Phosphorylierung durch den EGFR konnte auch *in vivo* in A431-Zellen (epidermoide Karzinomzelllinie) bestätigt werden. Außerdem wurde hier gefunden, dass SHP-1 sich nach der Tyrosinphosphorylierung selbst dephosphoryliert. Die Phosphorylierung an Tyr⁵³⁸ wurde auch für den PDGFR, den IR sowie c-Src gezeigt.^{110, 111} Eine c-Abl-abhängige Tyrosinphosphorylierung von SHP-1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden, wobei die SH3-Domäne von c-Abl konstitutiv an das SHP-1-Motiv 417-426 (WPDHGVPSSEP) der katalytischen Domäne assoziiert ist und durch den Einfluß von ionisierender Strahlung dessen C-terminale Tyrosinreste phosphoryliert. Dadurch wird die Jun-Kinase-Aktivität als Antwort auf genotoxischen Streß induziert.¹¹² Eine ähnliche Interaktion über die SH3-Domäne von Lyn mit SHP-1 als Antwort auf DNA-schädigende Agenzien wurde in U937-Zellen gefunden. Danach erfolgt die Phosphorylierung des Tyr⁵⁶⁴ durch Lyn, was die Aktivierung von SHP-1 stimuliert. Es wurde vorgeschlagen,

dass diese Aktivierung von SHP-1 als Antwort auf DNA-Schäden der negativen Regulation von Ereignissen dient, die durch die Lyn- und c-Abl-vermittelte Phosphorylierung aktiviert werden.¹¹³ Im Gegensatz zur Tyrosinphosphorylierung ist die Phosphorylierung an Serinresten, wie z.B. Ser⁵⁹¹, und ihre Konsequenzen bisher weitgehend unerforscht, widersprüchlich und wahrscheinlich Zelltyp-spezifisch.¹¹⁴

B) Nukleäre Lokalisation von SHP-1

Im Unterschied zu hämatopoetischen Zellen, in denen SHP-1 im Zytoplasma vorliegt, wird das Enzym in nicht-hämatopoetischen Zellen in den Kern importiert und wirkt hier im allgemeinen als positiver Regulator der Signaltransduktion.¹¹⁶⁻¹¹⁹ SHP-1 enthält eine Kernlokalisationssequenz (NLS) im C-Terminus (KVKK(X)₁₄KRK), wobei das KRK-Motiv der dominierende Partner in der NLS und daher für die Kernlokalisierung essentiell ist.^{118, 119} Interessanterweise fehlt diese Sequenz in SHP-2, so dass der Kernlokalisierung von SHP-1 eine funktionelle Bedeutung beigemessen wird, ohne das Details bisher verfügbar sind.¹¹⁹

C) Lipidbindung

Im Zusammenhang mit der Aktivierung des TCR und nachfolgender Tyrosinphosphorylierung multipler Proteine (z.B. Lck, ZAP-70), die in spezialisierten, Cholesterinreichen Domänen der Plasmamembran (*lipid rafts*) lokalisiert sind, wurde spekuliert, dass auch SHP-1 in diesen Domänen auftreten muß. Obwohl FAWCETT *et al.* kürzlich zeigten, dass eine SHP-1-Fraktion konstitutiv in *lipid rafts* exprimiert wird und dass diese Fraktion nach TCR-Stimulation dort verbleibt, sind die Informationen über die Konsequenzen dieser SHP-1-Lokalisation bisher nur unvollständig aufgeklärt.^{114, 115}

Daneben wurde gezeigt, dass Phospholipide wie Phosphatidsäure und in geringerem Maße Phosphatidylinositol-3,4,5-triphosphat, Dipalmitoylphosphatidylglycerol, Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat und Phosphatidylserin an den C-Terminus der Phosphatase binden und somit deren Aktivität stimulieren.¹²⁰ Als Bindungsstelle wurde eine 41 Aminosäuren umfassende Sequenz im C-Terminus erkannt, die in SHP-2 nicht existiert.

Nachweise für Hypothese II.

Eine intramolekulare, pY-unabhängige Regulation von SHP-1 durch Wechselwirkung der N-SH2-Domäne mit der PTP-Domäne konnte bereits 1994 mit Hilfe von Untersuchungen an SHP-1-Mutanten festgestellt werden. So zeigte die Δ SH2-SHP-1-Variante (PTP-Domäne und C-tail) eine normale Michaelis-Menten-Sättigungskinetik über den gesamten pH-Bereich 5,1-7,4. Außerdem wurde hier eine erste Serie an Peptiden untersucht, die zum Teil als Aktivatoren über die Bindung an die N-SH2-Domäne die Phosphataseaktivität stimulierten. Dazu zählten Peptide aus den Rezeptoren CSF-1R (pY⁷⁰⁸) und EpoR (pY⁴²⁹).⁹²

In einer späteren Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass im Unterschied zur N-terminalen SH2-Domäne die C-SH2-Domäne keinen Effekt auf die Aktivität hat.⁹³ Die strukturelle Ursache dafür, die anhand der Kristallstrukturanalyse des Enzyms aufgeklärt werden konnte, wurde bereits in Kapitel 3.2 näher erläutert.

Da die Interaktion von pY-Liganden mit der N-SH2-Domäne einen der Schwerpunkte der vorliegenden Arbeit darstellt und die dazu im Vorfeld bekannten Daten detailliert aufgeführt werden sollen, wird an dieser Stelle auf das Kapitel 3.5 verwiesen.

Nachweise für Hypothese III.

Aufgrund der Tatsache, dass SHP-1 bei physiologischem pH-Wert (7,4) inaktiv ist, dagegen bei einem pH von 5,4 aktiviert werden kann, ließ den Schluß zu, dass die für die katalytische Aktivität erforderliche Konformationsänderung (offene Konformation, siehe Kapitel 3.2) auch durch eine Änderung der Wechselwirkung zwischen Aminosäuren der N-SH2- und PTP-Domäne im Bereich der für die Autoinhibition verantwortlichen Kontaktfläche bewirkt werden kann.⁹² Als Ursache für diese Konformationsänderung wurde die Wechselwirkung des Asp⁶¹ der SH2-Domäne mit dem Lys³⁶² der PTP-Domäne identifiziert. Bei niedrigem pH-Wert liegt die Seitenkette des Aspartatrestes in undissoziierter Form vor, so dass die ionische Wechselwirkung mit der Lysinseitenkette nicht mehr zustande kommt, was wiederum die offene Konformation und damit die Aktivierung der Phosphatase zur Folge hat.

Regulation durch Oxidation

Neben den bisher erwähnten Mechanismen der Regulation der SHP-1-Phosphataseaktivität akkumulieren in jüngster Zeit auch immer mehr Informationen hinsichtlich der reversiblen Regulation und Inaktivierung von Phosphatasen durch Oxidation und S-Nitrosylierung.¹²¹⁻¹²⁴ Bereits 1998 wurde gezeigt, dass SHP-1 durch Oxidation mit H₂O₂ *in vitro* inaktiviert werden kann, wobei die Reversibilität der Reaktion durch Inkubation mit DTT und einer daraus resultierenden 44-99%igen Regeneration der PTP-Aktivität ebenfalls nachgewiesen werden konnte. Letzteres war dabei abhängig von der eingesetzten H₂O₂-Konzentration. Neben DTT können auch andere Antioxidantien, wie z.B. Glutathion und N-Acetylcystein, die H₂O₂-behandelte SHP-1 reaktivieren.¹²¹ Die Ursache für die reversible Veränderung der Phosphataseaktivität durch ROS (reactive oxygen species) ist die Bildung der Sulfensäure aus der Seitenkette des konservierten Cysteinrestes im Signaturmotiv des aktiven Zentrums (Kapitel 3.2). Da die Oxidation der Cys-Seitenkette zur Sulfensäure (1) reversibel ist, ist auch diese Art der intrazellulären Regulation der Phosphataseaktivität im Gegensatz zur irreversiblen Oxidation zur Sulfinsäure (2) oder Sulfonsäure (3) reversibel (Abb. 9).^{122, 124}

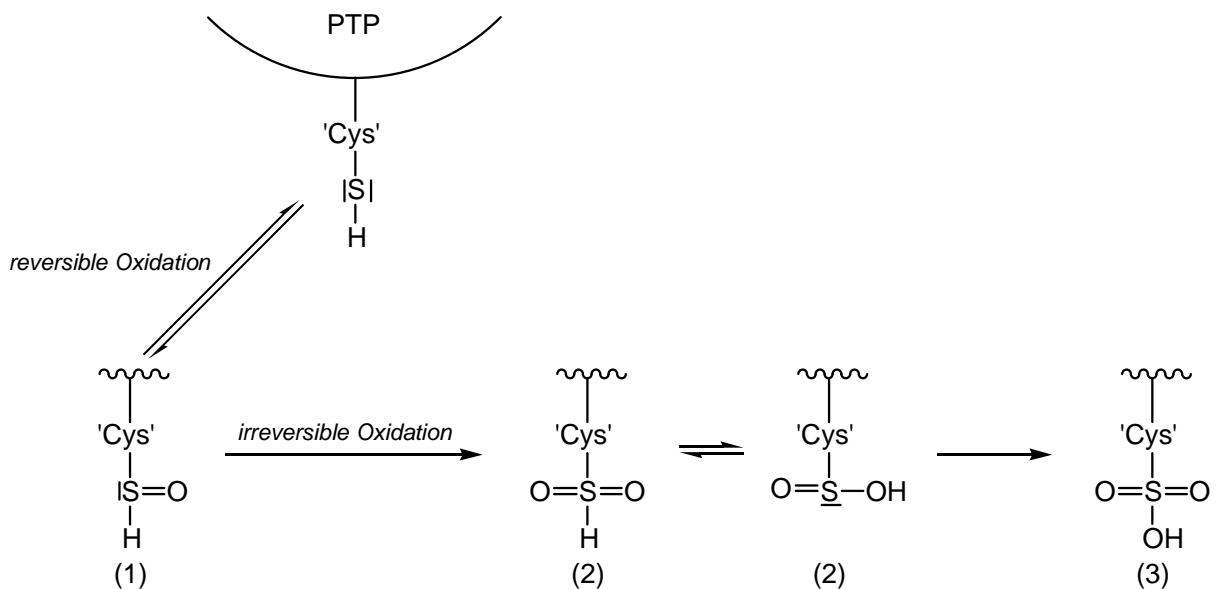


Abb. 9 Regulation der PTP-Aktivität durch oxidative Prozesse: Veränderung der Seitenkette des konservierten Cys im aktiven Zentrum^{modifiziert aus 124}

Problematisch in der Diskussion um die reversible Oxidation von PTPs durch ROS ist deren Toxizität für die Zelle, weshalb hohe Konzentrationen (mM-Bereich), wie sie teilweise in *in vitro*-Experimenten eingesetzt wurden, unter normalen physiologischen Bedingungen nicht existieren.^{125, 126} In der Zelle sind Schutzmechanismen (z.B. Peroxidasen) vorhanden, die das Auftreten solcher reaktiver Sauerstoffspezies unterbinden. Im Gegensatz dazu scheint es jedoch plausibel, dass ein oxidatives Signal (oxidativer Streß) aufgrund der besseren Redox Eigenschaften von Stickstoffmonoxid (NO) im Vergleich zu ROS in ein nitrosatives Signal umgewandelt wird. BARRETT *et al.* konnten beispielsweise für die PTPs SHP-1 und SHP-2 die S-Nitrosylierung des katalytischen Cysteinrestes nachweisen.¹²³ Dabei wurde durch die Wirkung von H_2O_2 oder Strahlung die Aktivität der Stickstoffmonoxidsynthase induziert, die wiederum für die Cys-Modifikation und damit die Hemmung der Phosphataseaktivität verantwortlich war.

3.4 Substrate der katalytischen Domäne

Strukturelle Aspekte der PTP-Domäne

Strukturelle Vergleiche der katalytischen Domänen verschiedener PTPs haben gezeigt, dass diese alle eine Phosphatbindeschleife (P-Loop) mit einem charakteristischen Signaturmotiv (allgemein: C(X)₅R) besitzen. Das Signaturmotiv enthält den invarianten Cys-Rest, der für die Phosphataseaktivität erforderlich ist. Die Seitenkette dieses Cysteins liegt bei physiologischem pH als Thiolat-Anion vor und dient als Nucleophil in der durch klassische PTPs katalysierten Reaktion, während die Seitenkette des Arginins eine zweizählige Wasserstoffbrücke mit zwei der Phosphatsauerstoffatome des Substrates bildet. Das aktive Zentrum der Phosphatase befindet sich in einer Spalte auf der Proteinoberfläche. Am Boden des aktiven Zentrums ist der P-Loop lokalisiert. Außerdem ist das aktive Zentrum von verschiedenen Oberflächenloops (z.B. WPD-Loop, Q-Loop), die für die Katalyse und Substraterkennung von Bedeutung sind, umgeben (Abb. 10). Im WPD-Loop befindet sich die ebenfalls invariante Aminosäure Asp, die für die Säure-Basen-Katalyse wichtig ist. Ein bedeutendes strukturelles Merkmal in klassischen PTPs ist die durch Substratbindung ausgelöste Konformationsänderung des WPD-Loops, die das Aspartat in das aktive Zentrum einführt und Wasserstoffbrücken zum phenolischen Sauerstoffatom des Tyrosins erlaubt, wodurch dieses Asp als Säure für die Katalyse zur Verfügung steht. Ein weiterer Loop (α 1- β 1), der auch als Substraterkennungsschleife bekannt ist, enthält Reste, die in spezifische Interaktionen mit dem Peptidrückgrat und dem Phosphotyrosin des Substrates involviert sind. Diese vier Schleifen (P-Loop, WPD-Loop, Q-Loop, α 1- β 1-Loop) umgeben das aktive Zentrum und definieren die 9 Å tiefe pTyr-Bindungstasche der klassischen PTPs.^{127, 129}

	P-Loop	WPD-Loop	Q-Loop
	403 409	356	437 440 446 450
PTP1B	HCSAGIGRS	TTWPDFGVP	RKFRMG-LIQTADQ
SHP-1	HCSAGIGRT	LSWPDHGVP	RAQRSG-MVQTEAQ
SHP-2	HCSAGIGRT	RTWPDHGVP	RSQRSG-MVQTEAQ

Abb. 10 Aminosäurealignment des P-, des WPD- und des Q-Loops verwandter PTPs

Mechanismus der Substratumsetzung

Die Hydrolyse des Phosphatmonoesters verläuft über ein kovalentes Cysteinylphosphat-Intermediat (Abb. 11). In einer zweistufigen Reaktion wird zunächst die Phosphorylgruppe des Substrates auf das Nucleophil des Enzyms übertragen, woraus das E-P-Zwischenprodukt resultiert. Dieses wird anschließend durch Wasser hydrolysiert (Abb. 11B). Mit Hilfe des chromogenen Substrates *p*-Nitrophenylphosphat konnte die Kinetik der PTP-katalysierten Reaktion aufgeklärt werden (Abb. 11C). Dabei wird zunächst *p*-Nitrophenol freigesetzt, gefolgt vom zweiten Reaktionsprodukt, dem Phosphat.¹²⁷

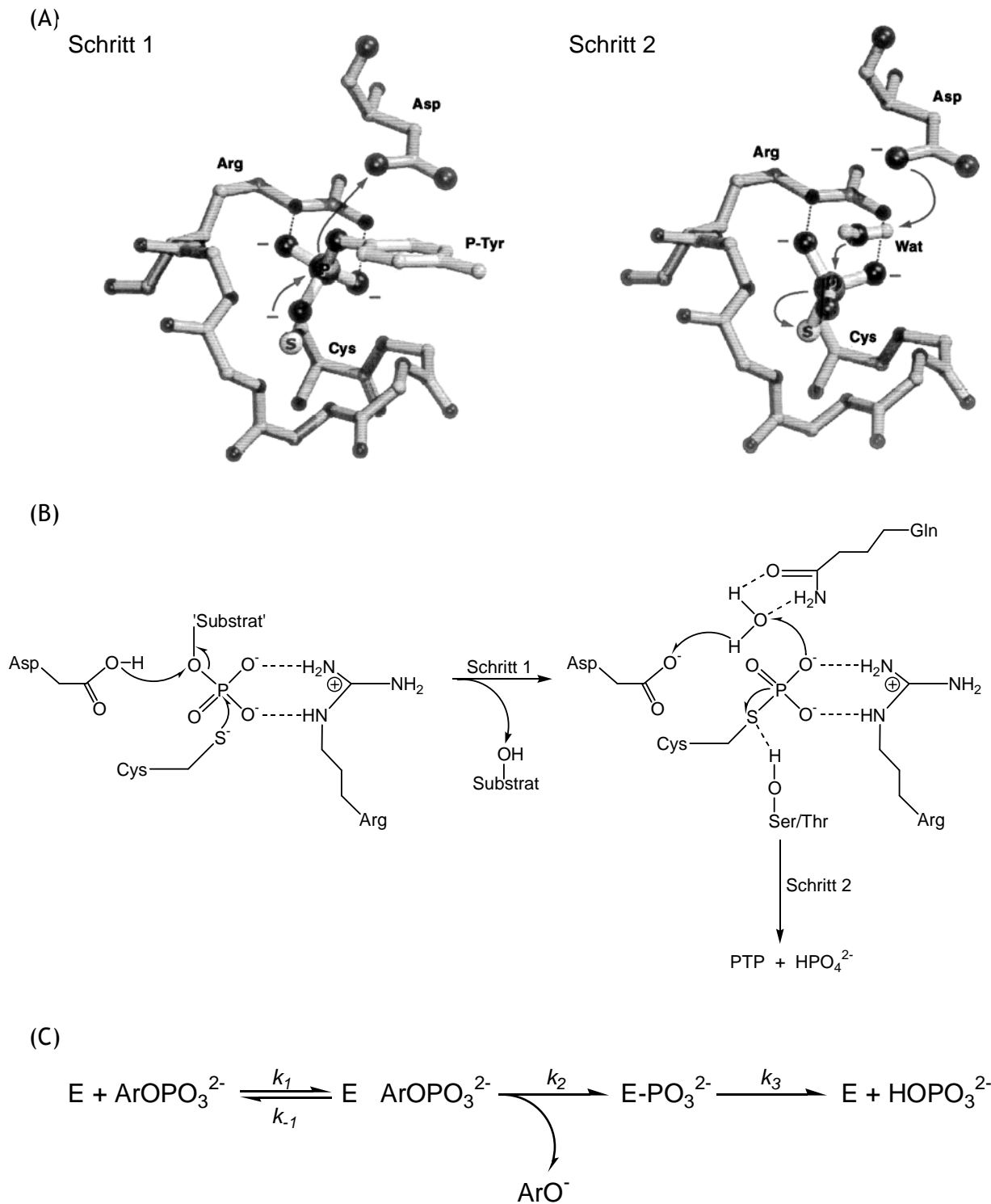


Abb. 11 Katalysemechanismus der Proteintyrosinphosphatasen:

- (A) Modell der Bildung des Enzym-Substrat-Komplexes durch Angriff des Thiolat-Anions am Phosphoratom des Substrates (1) und Hydrolyse des Cysteinylphosphat-Intermediates durch Angriff eines Wassermoleküls (2);¹²⁸
- (B) Mechanismus der PTP-katalysierten Reaktion;¹²⁷
- (C) Kinetik der PTP-katalysierten Reaktion.¹²⁷

Funktionelle Verbindung zwischen der Veränderung des WPD-Loops und Ligandbindung

Das für die Säure-Basen-Katalyse erforderliche Aspartat (Asp⁴²¹ in SHP-1) wird durch eine Änderung der Position des WPD-Loops (Aminosäuren Trp⁴¹⁹-Pro⁴²⁸), die nach der Substratbindung erfolgt, korrekt platziert. Die Bewegung dieser Schleife hat veränderte Wechselwirkungen einer Reihe von Aminosäuren der PTP-Domäne zur Folge und optimiert u.a. die *van der Waals*-Kontakte des aliphatischen Anteils der Seitenkette von Arg⁴⁶¹ mit Trp⁴¹⁹. Diese Interaktionen resultieren in der durch den WPD-Loop geschlossenen und katalytisch kompetenten Konformation.¹²⁷ Im Gegensatz zu PTP1B und SHP-2, in der der WPD-Loop vor Substratbindung in einer offenen Form vorliegt, wurde in SHP-1 eine halb-offene/halb-geschlossene Form dieses Loops gefunden.¹²⁹ Dieser Befund hat Auswirkungen auf die Substratspezifität von SHP-1 im Vergleich zu PTP1B, wie wir in unseren Arbeiten feststellen konnten (Kapitel 5.3). Andere konservierte Reste (z.B. Ser/Thr im P-Loop, Gln im Q-Loop) sind ebenfalls essentiell für eine optimale Substratumsetzung. So spielt Thr⁴⁶² eine Rolle in der Stabilisierung der Thiolatabgangsgruppe, während das ebenfalls konservierte Gln⁵⁰² für die präzise Platzierung des Wassermoleküls zur effizienten E-PO₃²⁻-Hydrolyse bedeutend ist (Abb. 11).¹²⁷

Substratspezifität

Bereits anhand der Kristallstrukturanalyse der katalytischen Domäne (C455S-Mutante) von SHP-1 in komplexierter Form mit zwei Peptiden aus SIRPα wurde vorgeschlagen, dass die Substratspezifität der Phosphatase durch die Aminosäuren N-terminal des pY-Restes bestimmt wird. Die Peptide binden in gestreckter Konformation an die Phosphatasedomäne. Zusätzlich zur pY-Bindungstasche, deren Basis hoch elektropositiv geladen ist, wurden noch weitere sechs Substratbindungstaschen definiert, die im Unterschied zur pY-Bindungstasche offener und mehr dem Lösungsmittel ausgesetzt sind.¹³⁰ Das Phosphotyrosin des Substrates ist in Wechselwirkungen mit den Aminosäuren Lys²⁷³, Lys²⁷⁹, Arg²⁷⁷ und Arg³⁶⁰ involviert.¹²⁹ Die C-terminalen Reste der Peptide interagieren hauptsächlich mit den α1/β1 und α5/α6-Motiven (Abb. 12). Als die wichtigste Bindungstasche auf der N-terminalen Seite des pY-Restes wurde die P-2-Bindungstasche identifiziert. Diese wird aus den Seitenketten der Reste Lys³⁶², Arg²⁷⁷ und Tyr²⁷⁸ gebildet. Die Aminosäuren N-terminal des P-2-Restes (pY-2) wechselwirken mit dem β5/β6-Motiv. Dieser Loopregion wird eine bedeutende Rolle hinsichtlich der Substratspezifität zugesprochen, wobei anhand der Kristallstruktur die Aminosäuren Asp und Glu in P-4 (pY-4) des Substrates vorgeschlagen wurden. Im Ergebnis dieser Studie wurde auf folgende Konsensussequenz für SHP-1-Substrate geschlossen: D/E-X-(L/I/V)-X_n-pY-X-X-(L/I/V) (n = 1, 2).¹³⁰

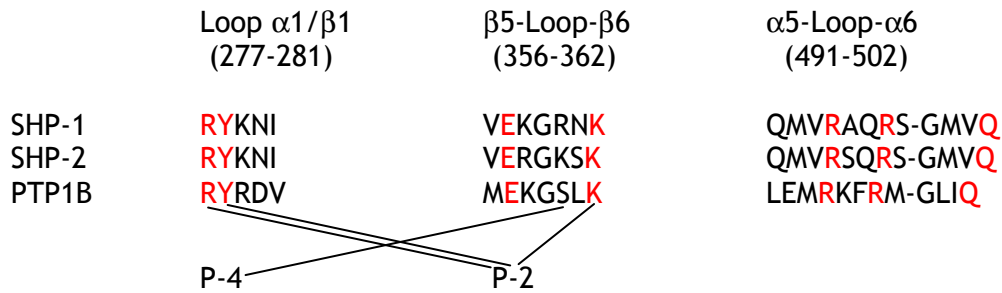


Abb. 12 Vergleich der Aminosäuresequenzen bestimmter Motive in den strukturhomologen SHP-1 und SHP-2 mit dem Prototyp der PTPs, PTP1B; (rot: konservierte Reste).^{modifiziert aus 130}

Im Zusammenhang mit kinetischen Untersuchungen zur Substratumsetzung wurde festgestellt, dass der K_m -Wert mit steigendem pH-Wert sinkt, weshalb vorgeschlagen wurde, dass das Phosphatdianion für die Substratbindung favorisiert ist.¹³¹ Als Bestätigung der Aussagen, die aus der Kristallstrukturanalyse abgeleitet wurden, zeigten verschiedene Untersuchungen zur Dephosphorylierung mit pY-Peptiden außerdem, dass die chemischen Eigenschaften der Primärstruktur in der Umgebung der Dephosphorylierungsstelle entscheidend zur Substratspezifität beitragen.^{91, 92, 131, 132}

Ein erster Hinweis darauf, dass positiv geladene Aminosäuren in P-1 (pY-1) nicht vorteilhaft für die Substratbindung und -umsetzung sind, wurde bereits 1994 anhand einer Serie von 13 Peptiden geliefert.⁹² Präzisiert wurde jedoch die Konsensussequenz für SHP-1-Substrate erst 2002 mit Hilfe des Screenings einer Phosphopeptidbibliothek der Sequenz RNNXXpYANH₂ (X = 19 proteinogene Aminosäuren mit Ausnahme von Cys). Dabei wurde die Sequenz D/EXpY als essentiell für effiziente SHP-1-Substrate definiert.¹³² Diese Sequenz liegt in den bisher identifizierten physiologischen Substraten der Phosphatase tatsächlich vor, wie die Beispiele Pyk2,¹³³ SLP-76,¹³⁴ Jak2,⁵¹ Src,¹³⁵ Lck,¹³⁶ und TrkA,¹³⁷ zeigen. Eine detailliertere Analyse der Substratprimärstruktur, die wir aufgrund von Dephosphorylierungsstudien an mono- und mehrfach-phosphorylierten Peptiden durchführen konnten, erfolgt in Kapitel 5.3.

3.5 Interaktionspartner der SH2-Domänen

Die ersten Hinweise auf eine Bedeutung der SH2-Domänen für die Regulation und Funktion der Phosphatase SHP-1 und damit für die Regulation des hämatopoetischen Zellwachstums wurden zu Beginn der 90iger Jahre veröffentlicht. Beispielsweise konnten Yi et al. zeigen, dass SHP-1 über seine N-terminale SH2-Domäne mit der β -Kette des IL-3R interagiert und anschließend den Rezeptor dephosphoryliert. Eine erhöhte SHP-1-Konzentration führte zur Verminderung des Levels an IL-3-induzierter Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors und zur dramatischen Unterdrückung des Zellwachstums, während umgekehrt reduzierte SHP-1-Konzentrationen zu einer Erhöhung der IL-3-induzierten Tyrosinphosphorylierung des Rezeptors und einer erhöhten Wachstumsrate führten.⁴⁹ Die Tatsache, dass solche SH2-Domänen, die heute als Prototyp für Interaktionsmodule in Proteinen gelten, in einer Vielzahl von Proteinen identifiziert wurden, initiierte zur gleichen Zeit intensive Untersuchungen, die zum Verständnis der biochemischen und funktionellen Eigenschaften dieser Domänen beitragen sollten.

Zur Aufklärung der molekularen Basis der SH2-Domänen-Protein-Interaktionen und damit der zugrundeliegenden Prinzipien der Erkennung von Phosphotyrosin-haltigen Sequenzen durch SH2-Domänen wurden Techniken entwickelt, die durch parallele Testung einer großen Vielzahl an Phosphopeptiden die Vorhersage optimaler und spezifischer Erkennungsmotive einer individuellen SH2-Domäne erlaubten. Die Anwendung dieser Methode des Screenings einer Phosphopeptidbibliothek konnte bereits 1994 erfolgreich zur Ermittlung der Bindemotive ausgewählter SH2-Domänen, darunter die der Proteine Src, Abl, Nck, PLC γ , p85 PI3K, Grb2, Csk, Vav, SHP-1 und SHP-2, eingesetzt werden.¹³⁸ Diese Untersuchungen bildeten u.a. die Grundlage für die Klassifizierung der SH2-Domänen anhand ihrer Erkennungssequenzen und der proteinseitig mit diesen Sequenzen interagierenden Aminosäurereste. Bereits zu diesem Zeitpunkt wurde festgestellt, dass die SH2-Domänen der PTPs SHP-1 und SHP-2 einer Klasse angehören, die sich hinsichtlich Selektivität von den SH2-Domänen anderer Proteine wie z.B. der Src-Familie oder Grb2 unterscheiden. Ein optimales Motiv für die Assoziation an die SHP-1- bzw. SHP-2-SH2-Domänen wurde wie folgt spezifiziert: pY-hydrophob-X-hydrophob (X = alle Aminosäuren außer Trp und Cys).¹³⁸ Da zu dieser Gruppe dennoch eine Vielzahl von SH2-Domänen weiterer Proteine gehören, gingen nachfolgende Bestrebungen verstärkt der Frage einer Unterscheidung der SH2-Domänen innerhalb dieser durch SONGYANG *et al.* festgelegten Klassen nach. Außerdem zeigten Studien an intrazellulären Interaktionspartnern dieser Proteinen, dass innerhalb einer Klasse zusätzliche Spezifitäts-unterschiede existieren müssen.

Im Fall von SHP-2 zeigte eine Untersuchung der Kinetik der Bindung pY-enthaltender Peptide aus der Sequenz der β -Untereinheit des PDGFR (DTSSVLpY¹⁰⁰⁹TAVQPN) schließlich,

dass die minimal erforderliche Länge zur hochaffinen Bindung sechs Aminosäuren (VLpYTAV) umfaßt. Desweiteren wurde mit Hilfe eines systematischen Alanin-Scans festgestellt, dass neben dem Phosphotyrosinrest die Aminosäuren in den Positionen +1, +3 und -2 (relativ zu pY⁰) kritisch für die Bindung sind.¹⁴² Eine Besonderheit der Konsensussequenzen für diese SH2-Domänen ist dabei die Spezifität in pY-2, die bei anderen SH2-Domänen nicht vorhanden ist.^{142, 153}

Die Tatsache, dass SHP-1 und SHP-2 sehr verschiedene Funktionen *in vivo* ausüben und dass sowohl gemeinsame als auch unterschiedliche Interaktionspartner identifiziert wurden (Tab. 1), ließ erneut den Schluß zu, dass sich die SH2-Erkennungssequenzen dieser beiden Proteine trotz der globalen Gemeinsamkeiten unterscheiden. Daraufhin folgten Untersuchungen mit spezifisch für SHP-1 bzw. später mit Hilfe verbesserter Screeningmethoden für SHP-1, SHP-2 und SHIP-1 konstruierten Peptidbibliotheken, die eine genauere Spezifikation der für die Bindung essentiellen Aminosäuren in den einzelnen Positionen an die vier SH2-Domänen beider Phosphatasen ermöglichten (Abb. 13).^{143, 144}

SHP-1	<i>N-SH2</i>	<i>C-SH2</i>
Klasse I:	LXpY(M/F)X(F/M)	(T/V/I)XpY(Abu/A/T)X(L/M/V)
Klasse II:	LXpYAXL	
SHP-2	<i>N-SH2</i>	<i>C-SH2</i>
Klasse I:	(I/L/V/M)XpY(T/V/A)X(I/V/L/F)	(T/V/I/Y)XpY(A/S/T/V)X(I/V/L)
Klasse II:	W(M/T/V)pY(Y/R)(I/L)X	
Klasse III:	(I/V)XpY(L/M/T)Y(A/P/T/S/G)	
Klasse IV:	(I/V/L)XpY(F/M)XP	

Abb. 13 Klassen minimaler Konsensussequenzen der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 (M = Nle)^{143, 144}

Im Gegensatz zu den N-terminalen SH2-Domänen wurde für die C-SH2-Domänen je eine Klasse gefunden, deren Peptide spezifisch an diese Domäne binden. Unterschiede zwischen beiden Phosphatasen wurden jedoch auf der Ebene der N-SH2-Domänen beobachtet. So wurden für die Bindung an SHP-1 N-SH2 zwei Klassen hochaffiner Peptide gefunden, während für SHP-2 vier verschiedene Klassen minimaler Konsensussequenzen existieren. SHP-1 N-SH2 ist somit hinsichtlich der bevorzugten Aminosäuren in den relevanten Positionen selektiver als SHP-2 N-SH2.

Die für beide Phosphatasen bekannten natürlichen Interaktionspartner, die für SHP-1 in Tabelle 1 zusammengefaßt wurden, spiegeln die Eigenschaften der experimentell ermittelten Konsensussequenzen eindeutig wider.

Tabelle 1. Humane Interaktionsproteine der Proteintyrosinphosphatase SHP-1*

Interaktionspartner	Sequenz	Referenzen
FcγRIIB**	ITpYSLLMHP	141/163/168/173/179
IL3-Rβ	LEpYLCLPAG	49/146/154
IL4-Rα	IVpYSALTCH	154/176
ILT-2/LIR-1	VTpYAQLHSL, SlpYATLAIH	54/151/166
ILT-2/LIR-1(MIR-7)	VTpYAEVKHS, VTpYAQLHSL	54
ILT-3/LIR-5	VTpYAKVKHS, VTpYAQLASF	149
IREM-1 (IgSF13)	LCpYADLTLO, VEpyVTMASL,	193/194
IRC-1	ISpYASLTGL, TEpySTISRP LHpYANLELL, VEpySTVASP, HpYASVVFD,	206
Siglec-2 (CD22)	SDpYSVIRKT	
Siglec-3 (CD33)	VTpYSALHKR, IHpYSELIQF, VDpYVILKH	139/145/164/167
Siglec-5 (CD170)	LHpYASLNHFH, TEpySEVRTQ	161/171/208
Siglec-7	LHpYASLSFS, TEpySEIKTS	200
Siglec-9	IQpYAPLSFH, NEpySEIKIP	190-192
Siglec-10	LQpYASLSFQ, TEpySEIKIH	191/192
	LDpYINVVPT, LHpYATLNFP,	182/188
	ADpYAEVKFQ	
Siglec-11	LHpYASLSFQ, TEpySEIKIH	187
Siglec-12 (S2V)	IQpYASLSFH, YEpySEINIP	183
CD72	ITpYADLRFV	15/157/178
CD84	TIpYTYIMAS, TVpYSEVQFA	207
CD94/NKG2-A	VIpYSDLNLP, ITpYAEELNLQ	156
SIRPα-1 (SHPS-1, BIT, MyD-1, PTPNS-1)	ITpYADLNLP, TEpyASIQTS, LTpYADLDMV	52/57/60
KIR 2DL1 (p58, NKAT-1)	VTpYTQLNHC, IVpYTELPNA	34/162/197
KIR 3DL1 (p70, NKAT-3, NKB-1)	VTpYAQLDHC, ILpYTELPNA	34/162/198
SPAP1	VVpYSQVWSM, VIpYSSVKKS	208
LAIR-1	VTpYAQLDHW, ITpYAAVARH	169/180/186
PILRα (FDF03)	IVpYASLALS, TLpYSVLKA	170/203
MAFA	VIpYSMLELP	174
G6b (MHC III-Protein)	LLpYADLDHL, TIpYAVVV	175/209
BTLA	LLpYSLLPLG, IVpYASLNHS, TEpyASICVR	189/202
PD-1	TEpyATIVFP	204-206
NTB-A	LEpYVSVSPT, TVpYASVTHS, TIpYSTINHS	199
LLIR	ITpYAEVRFK	181
EpoR	LKpYLYLVVS	140/195/196
c-Kit (SCF-R)	YVpYIDPTQK	155
EGFR	AEpYLRVAPQ	65/148
Ros	LNpYMLVATE, LNpYACLAHS	66
TNFR1	AQpYSMLATW	184
PECAM-1	VQpYTEVQVS, TVpYSEVRKV	159/171/177
Bgp1 (CEACAM-1, CD66)	VTpYSTLNFE, IlpYSEVKKQ	160
Gab2	VDpYLALDFQ, VDpYVQVDKE	185
p120 ^{ctn}	RGpYELLFQP, RIpYISLLKE	172
STAT5	LNpYLIYVFP, DGpYVKPQIK	117/201
TRK-T3	ITpYDELVLM	207

*Aufgeführt sind ausschließlich humane Proteine, in denen die interagierenden Sequenzen nachgewiesen wurden. **umstritten; ***Die Bedeutung der Aminosäuren C-terminal der minimalen Konsensussequenz (hervorgehoben) wird in Kapitel 5.2 diskutiert.

In einer Reihe der in Tabelle 1 aufgeführten Proteine ist mehr als ein interagierendes Sequenzmotiv ermittelt worden. Viele dieser Proteine enthalten ITIM- bzw. ITAM-Motive (siehe Kapitel 2.1), deren Assoziation an beide SH2-Domänen von SHP-1 nachgewiesen werden konnte. Bindungsstudien mit verschiedenen Enzymen, die ebenfalls zwei SH2-Domänen im Tandem-Modus enthalten, wie z.B. PI3K p85, ZAP-70, Syk, SHP-2 und PLC γ 1 zeigten, dass durch die simultane Belegung zweier SH2-Domänen durch biphosphorylierte (auch bivalente) Liganden eine höhere Spezifität im Vergleich zur Wechselwirkung mit monophosphorylierten Liganden erreicht wird.²¹⁰ Die höhere Bindungsaffinität kommt dabei durch die folgenden kombinatorischen Effekte zustande:

- 1) Jede Domäne besitzt eine intrinsische Bindungsspezifität.
- 2) Die relative Orientierung zwischen den Bindungsstellen wird durch strukturelle Einschränkung limitiert.
- 3) Die Liganden (meist ITIM-Motive) sind zur Assoziation an zwei Domänen bereits richtig zueinander orientiert.

Der Aspekt der Spezifität der durch SH2-Domänen-vermittelten intrazellulären Signalweiterleitung hat eine große Bedeutung für das Verständnis, wie individuelle Signale ihre gegenseitige Ausschließlichkeit erhalten und darüber die stromabwärts-Reaktionen beeinflussen.²¹¹ Die Verfügbarkeit von zwei unabhängigen Bindungsstellen auf ein- und demselben Proteinmolekül ermöglicht es, über eine spezifischere Erkennung ein höheres Niveau an Kontrolle und Regulation der von den entsprechenden Interaktionen abhängigen Signalprozesse zu erreichen.

4 ENTWICKLUNG VON EFFEKTOREN FÜR PROTEINTYROSINPHOSPHATASEN

4.1 PTP-Inhibitoren (Substratanaloge Verbindungen)

Störungen im fein aufeinander abgestimmten Wechselspiel der PTK- und PTP-Aktivitäten sind die Ursache für eine Vielzahl von Krankheiten (z.B. verschiedene Krebserkrankungen, Diabetes und Fettsucht), weshalb PTKs und PTPs seit einigen Jahren im Fokus des Interesses der Arzneimittelentwicklung stehen. Die Vielfalt an Verbindungen, die hinsichtlich Inhibierung der Aktivität von PTPs bisher untersucht und angewandt worden ist, erstreckt sich von Vanadium(V)-oxid und davon abgeleiteten Verbindungen über Naturstoffe und speziell entwickelte nicht-hydrolysierbare Phosphotyrosinmimetika bis hin zu sogenannten ‚Two-site-binders‘.²¹² Prinzipiell gibt es zwei limitierende Faktoren in der Entwicklung von PTP-Inhibitoren:

- 1) Das aktive Zentrum (z.B. P-Loop, siehe Kapitel 3.4) ist innerhalb der PTP-Familie hoch-konserviert, weshalb die Wahrscheinlichkeit ein Molekül zu erhalten, das ausschließlich eine individuelle PTP selektiv angreift, sehr gering ist.
- 2) Eine bestimmte PTP kann multiple Signalwege regulieren bzw. kann auch ein einzelner Schlüsselsignalweg durch verschiedene PTPs reguliert sein.

Vanadium(V)-oxid und davon abgeleitete Substanzen, die strukturell die Phosphatgruppe des natürlichen Enzymsubstrates nachahmen, sind unspezifische Phosphataseinhibitoren, was ihren therapeutischen Wert entsprechend stark mindert. Bis Mitte der 90iger Jahre war Natriumorthovanadat dennoch der einzige bekannte Phosphatase-Inhibitor. Intensive Forschung auf dem Gebiet führte jedoch innerhalb weniger Jahre zur Identifizierung verschiedener Naturstoffe (und ihrer Derivate) sowie anderer synthetischer Moleküle, die mehr oder weniger selektiv bestimmte Phosphatasen, nicht nur PTPs, hemmen.

4-Isoavenaciolid (1) beispielsweise ist ein irreversibler Inhibitor, der die dual-spezifische Phosphatase VHR im mikromolaren Bereich ($IC_{50} = 1,2 \mu M$) inhibiert (Abb. 14). Daneben wird auch die Aktivität der Phosphatasen Cdc25B und PTP1B durch (1) ähnlich stark beeinträchtigt, während CD45 und die Ser/Thr-Phosphatasen PP2A und PP1 nicht gehemmt werden.²¹³ Abgeleitet vom Naturstoff *Dephostatin* (2) wurden selektivere und stabilere Verbindungen (z.B. 3) generiert, die potent und mit moderater Selektivität PTP1B und SHP-1 (30fach gegen CD45, 100fach gegen LAR) hemmen.^{212, 214}

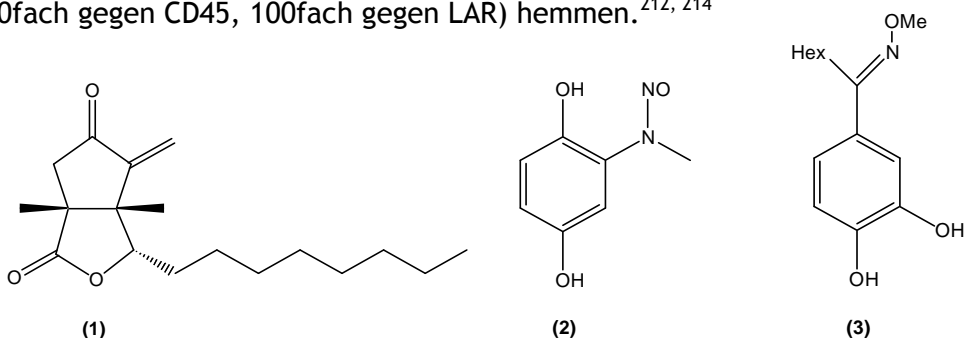


Abb. 14 Ausgewählte von Naturstoffen-abgeleitete PTP-Inhibitoren

Neben der Inspiration aus dem reichen Pool der Naturstoffe wurde auch rationales Design in der Entwicklung von PTP-Inhibitoren, wie z.B. Molecular Modeling basierend auf Kristallstrukturanalysen, eingesetzt. Die meisten dieser Ansätze fokussierten auf die Entwicklung von kompetitiven Inhibitoren, die ein nicht-hydrolysierbares Phosphotyrosin-Mimetikum enthielten. Die Phosphotyrosylgruppe wurde bisher z.B. durch Sulfotyrosyl-, Thiophosphotyrosyl, O-Dithiophosphotyrosyl-, Phosphonomethylphenylalanin (Pmp), O-Malonyltyrosyl-, Fluoro-O-malonyltyrosyl- und sehr erfolgreich auch durch Difluorophosphonomethylphenylalanin (F₂-Pmp) ersetzt.²¹³ Diese und andere Ansätze sind umfangreich in der Literatur beschrieben worden,^{212, 213} weshalb im Folgenden nur die für SHP-1 relevanten Entwicklungen zusammengefaßt dargestellt werden sollen.

Abgeleitet vom *Salioxon* (4) wurden verschiedene *Aryloxirane* (5-7) als Inhibitoren für PTPs synthetisiert (Abb. 15). Zwar verbesserte die Substitution des Phenylrings durch einen Naphthalenring den Einfluß auf die Phosphataseaktivität, jedoch lagen die Inhibitor-konzentrationen für eine halbmaximale Inaktivierung von PTP1B und SHP-1 immer noch im mikromolaren Bereich.²¹⁶ α -Bromacetophenonderivate wirken ebenfalls als PTP-Inhibitoren durch kovalente Alkylierung des konservierten Cys im aktiven Zentrum. Da sie im Gegensatz zu den negativ geladenen pY-Mimetika neutral sind, konnten diese Verbindungen sogar durch die Membran von B-Zellen diffundieren. In einem Ansatz zur Verbesserung der Wirksamkeit und Selektivität dieser Verbindungen wurden verschiedene Modifikationen an Haloacetophenonderivaten vorgenommen.²¹⁷ Aus diesen Studien ist klar, dass ein aromatischer Ring essentiell für die hochaffine Bindung an das aktive Zentrum ist. Dagegen ist die exakte Natur des aromatischen Ringes weniger kritisch, da sowohl elektronenziehende als auch elektronendrückende Substituenten in *para*-Position die Effizienz des Inhibitors nur geringfügig beeinflussten. Im Gegensatz dazu wirkten sich Substituenten in *ortho*-Position negativ auf die inhibitorische Wirksamkeit aus. Die Ergebnisse dieser Untersuchung führten zu dem Schluß, dass es schwierig ist, die Inhibitorpotenz durch Modifikation der Struktur des Phenylringes zu verbessern. Es wurde deshalb versucht, über eine zusätzliche Bindedomäne (z.B. Peptidyleinheit) in *para*- oder *meta*-Position am Phenylring, die mit dem Protein in unmittelbarer Nähe des aktiven Zentrums interagieren würde, die Inhibitorpotenz zu verbessern. Diese Rationale stützt sich auch auf Befunde, die im Zusammenhang mit Kristallstrukturanalysen von Peptid-komplexierter PTP1B ermittelt wurden ('Two-side-binders', siehe unten). Die resultierenden Verbindungen 8 und 9 stellten sich jedoch als potente Inhibitoren für PTP1B heraus mit einer ca. 50fachen Selektivität für PTP1B gegenüber SHP-1.

Während die α -Bromacetophenonderivate mit dem katalytischen Cys reagieren, gehen die später vorgestellten *Peptidylaldehyde* (z.B. 10) eine kovalente Bindung mit dem konservierten Arg im aktiven Zentrum ein.²¹⁸ Während diese Verbindungen PTP1B inhibieren, aktivieren sie SHP-1 in Konzentrationen bis 150 μ M. NMR-Studien ergaben, dass

die Inhibierung in einer reversiblen Imin-(Enamin)-Bildung zwischen der Aldehydfunktion und dem Arg (221 in PTP1B) im aktiven Zentrum begründet liegt. Die Aktivierung von SHP-1 im niedrigen Konzentrationsbereich kommt demnach durch dieselbe Reaktion mit dem konservierten Arg der N-terminalen SH2-Domäne zustande, die in PTP1B nicht vorhanden ist.

Als reversible 'slow-binding'-Inhibitoren von PTPs wurden kürzlich *trans-β-Nitrostyren-derivate* vorgestellt (Abb. 15), die ebenfalls direkt mit dem konservierten Cys im aktiven Zentrum reagieren. Auch diese Verbindungen zeigten, dass eine nucleophile Substitution an Cys für die Inhibierung der PTPs verantwortlich ist. Die C=C-Bindung in **11**, **12** dagegen war nicht direkt notwendig für die Hemmung. Es wurde stattdessen diskutiert, dass die C=C-Bindung möglicherweise eine rigide planare Geometrie des Moleküls aufrechterhält, die kritisch für die Bindung und Positionierung der Nitrogruppe für den nucleophilen Angriff ist.²¹⁹

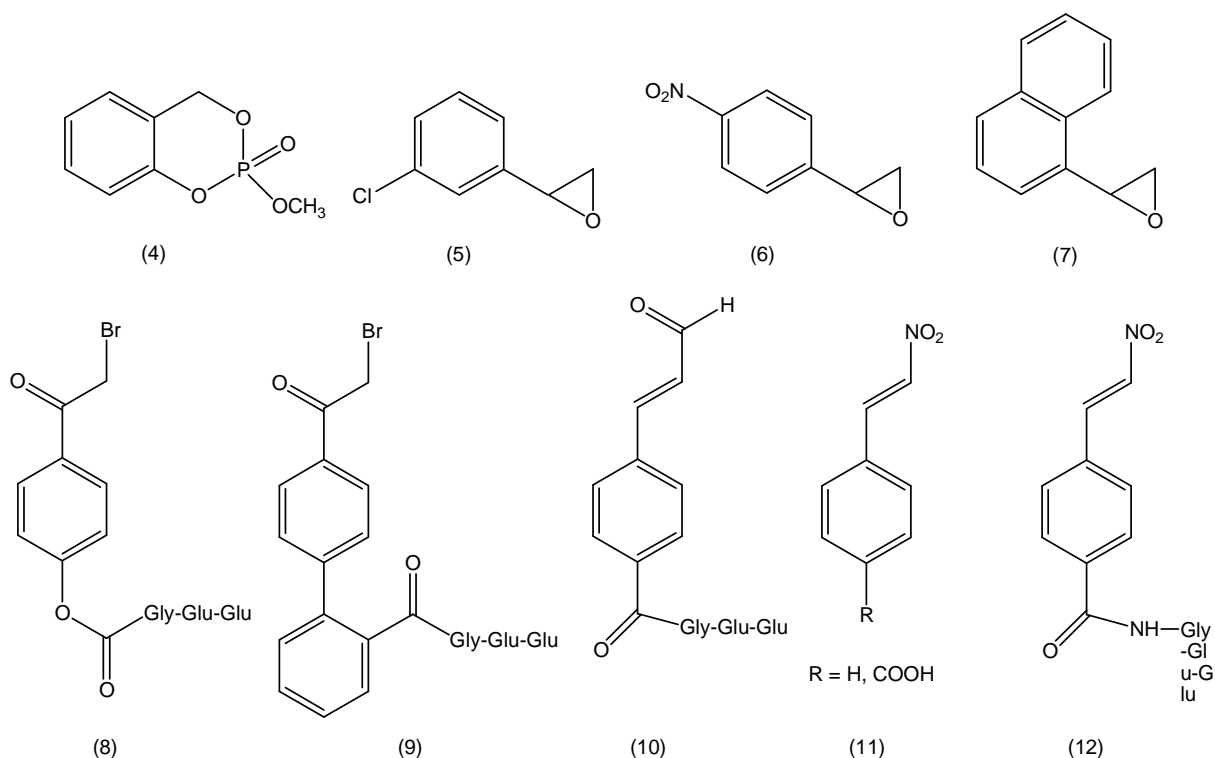


Abb. 15 Mittels rationalem Design entwickelte PTP-Inhibitoren

Ein bereits erwähntes Hauptproblem in der Entwicklung von selektiven PTP-Inhibitoren ist die hohe Sequenzhomologie des katalytischen Zentrums innerhalb dieser Enzymklasse. So zeigte sich, dass die oben vorgestellten Inhibitoren für SHP-1 ebenfalls, mitunter auch effizienter, PTP1B inhibierten. In diesem Zusammenhang schien die durch ZHANG et al. entdeckte zweite, nicht-katalytische Bindungsstelle in PTP1B, die sich in unmittelbarer Nähe zum aktiven Zentrum befindet und eine geringere Homologie innerhalb der PTPs aufweist, bedeutend.

Diese zweite Arylphosphat-Bindungsstelle eröffnete neue Möglichkeiten für das Design von PTP-Inhibitoren, da vermutet wurde, dass ein bivalenter Ligand („two-site-binders“) selektiver als die klassischen „active-site“-Verbindungen bindet. Im Fokus des Interesses stand dabei vorrangig PTP1B. Es hat sich gezeigt, dass mit solchen bivalenten Liganden PTP1B effizient und selektiv (z.B. gegenüber LAR, SHP-2) gehemmt werden kann (Abb. 16), obwohl die Selektivität stark variierte (teilweise nur 2-7fach, mitunter hohe Selektivität um 30fach) und die Mehrheit dieser Verbindungen an der schlechten Membrangängigkeit scheitern. Trotz der bisherigen Erfolge und der erlangten Erkenntnisse hinsichtlich Struktur und Funktion der PTPs ist die Forschung auf diesem Gebiet und im Speziellen in der Entwicklung von selektiven PTP-Inhibitoren noch in ihren Anfängen.

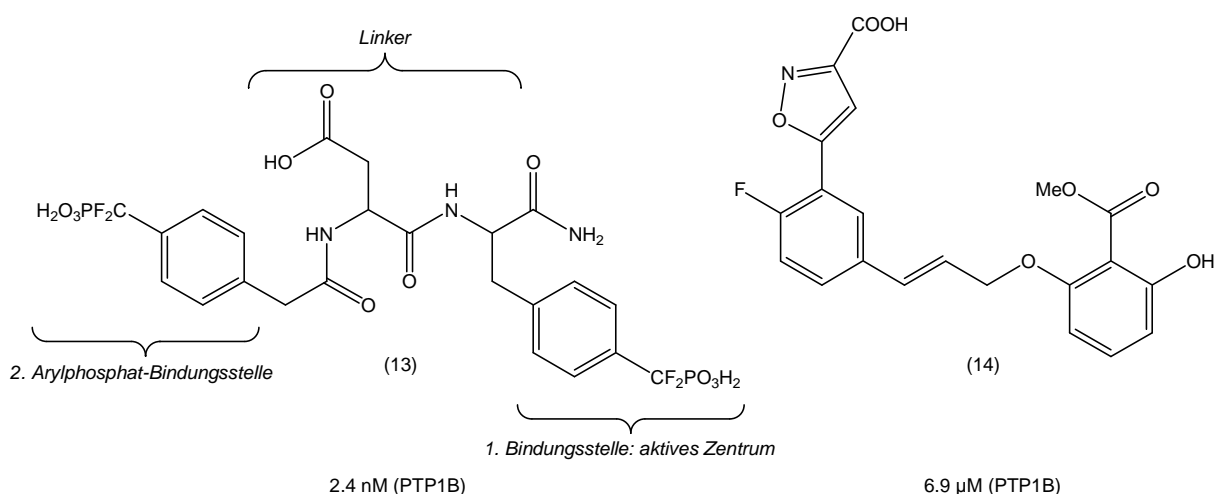


Abb. 16 „Two-site-binders“ als Alternative in der Entwicklung selektiver Inhibitoren für PTP1B²¹²

4.2 Inhibitoren der SH2-Interaktion

Ein Großteil der bisherigen Forschung auf dem Gebiet der Entwicklung von PTP-Inhibitoren war auf den Prototyp dieser Enzymklasse, PTP1B, fokussiert. In SHP-1 und SHP-2 liegen jedoch im Gegensatz zu PTP1B neben der hoch-konservierten katalytischen Domäne zusätzlich zwei SH2-Domänen vor. Demnach liegt es nahe, diese Proteinmodule in die Entwicklung von spezifisch bindenden Inhibitoren einzubeziehen, da andere Phosphatasen diese Proteinmodule nicht enthalten. Legitimiert wird diese Strategie (Kapitel 5.2) u.a. durch die Vielzahl von niedrig-molekularen Verbindungen, die als Mimetika zur Intervention von SH2-Domänen-Protein-Interaktionen, z.B. für Grb2, PI3K p85, Src, PLCγ, ZAP-70, entwickelt wurden und auch weiterhin optimiert werden.²²⁰⁻²²³ Bereits 1995 stellte SMITHGALL fest, dass die Identifizierung von peptidomimetischen Leitstrukturen, die spezifisch SH2-Domänen-Protein-Interaktionen blockieren, mehr Sequenzinformationen erfordern als aus den Screenings kombinatorischer

Peptidbibliotheken erhalten werden.²²⁴ Diese Informationen bilden jedoch eine nützliche Grundlage zum einen für die Identifizierung neuer natürlicher SH2-Bindepartner des betreffenden Proteins und zum anderen für die Entwicklung von Effektoren für SH2-Domänen-Protein-Wechselwirkungen. Im Hinblick auf Effektoren für SHP-1 wurde der erste Ansatz, die Verwendung von Peptidylzimtaldehyden, zur Blockierung der N-SH2-Domäne von PEI und Mitarbeitern oben bereits vorgestellt. Hier erfolgt die Hemmung in Konzentrationen >150 μM durch Bindung des Liganden an das konservierte Arg im aktiven Zentrum, nachdem die Assoziation an die SH2-Domäne zunächst die Aktivierung des Enzyms ausgelöst hat. Keine dieser Verbindungen weist jedoch eine effiziente Hemmung von SHP-1 ohne Stimulation der Enzymaktivität im Bereich geringer Inhibitor-Konzentrationen auf.

Trotz des therapeutischen Potentials der Hemmung von SHP-1 und SHP-2 gibt es bisher keinen spezifischen und effektiv inhibierenden SH2-Liganden. Kürzlich wurde über ein in Zellen eingeführtes GST-Fusionsprotein eines phosphorylierten ITIM-Motives aus dem Glykoprotein PZR berichtet, welches die Aktivität von SHP-2 vermutlich über eine Assoziation an deren N-terminale SH2-Domäne blockiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass die Wachstumsfaktor-induzierte Aktivierung von ERK1/2 gehemmt war. Über den Mechanismus der Inhibierung der in diesen Signalweg involvierten SHP-2 wurden jedoch keine Aussagen gemacht.²²⁵

5 STRATEGIEN ZUR MODULATION DER ENZYMAKTIVITÄT VON SHP-1

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, zur Entwicklung von hochaffinen und selektiven Effektoren der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 beizutragen. Aufgrund der in den Kapiteln 3 und 4 dargelegten strukturellen Informationen, die für das Zielprotein verfügbar waren, wurden von uns die in Abbildung 17 aufgezeigten Strategien für SHP-1-Effektoren vorgeschlagen.

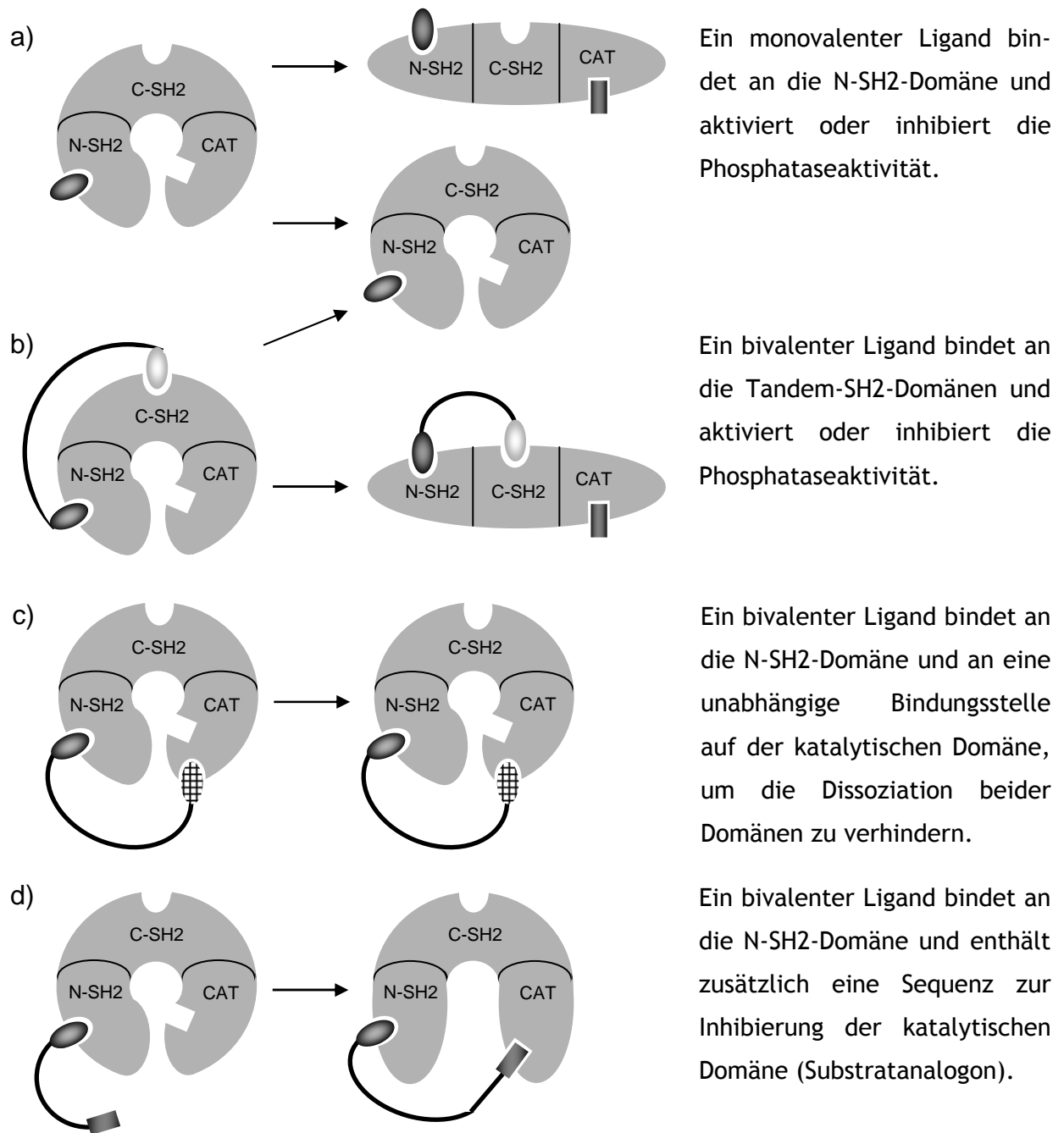


Abb. 17 Vorschläge für Modulatoren der Enzymaktivität von SHP-1 (schematische Darstellung der Phosphatase)

Um diese Strategien erfolgreich umsetzen zu können, waren Untersuchungen erforderlich, die über das reine Screening von Peptidbibliotheken zur Akkumulation von Informationen über die Erkennungssequenzen der SH2-Domänen hinausgingen (Kapitel 3.5). Unsere Arbeiten, die in den nachfolgend aufgeführten wissenschaftlichen Veröffentlichungen zusammengefaßt sind, zielten vorrangig auf einen zusätzlichen Erkenntnisgewinn, um das rationale Design insbesondere von SHP-1-Inhibitoren perspektivisch zu erleichtern.

Wir konzentrierten uns dabei zunächst auf die vielversprechenden Strategien (a) (Kapitel 5.1) und (c) (Kapitel 5.2), erarbeiteten aber u.a. auch Beiträge zur Substratspezifität der Phosphatase für Strategie (d) (Kapitel 5.3). Im Fall von Strategie (b) ist die Orientierung der Liganden, die an die N- bzw. C-SH2-Domäne binden, im Gegensatz zu z.B. den Tandem-SH2-Domänen enthaltenden Kinasen Syk und ZAP-70, entgegengesetzt.²²⁶ Obwohl solche bivalenten Liganden aufgrund ihrer voraussichtlich höheren Bindungsaffinität von großem Interesse sind,²²⁷ gibt es derzeit nur unzureichende Informationen über die Kombination der beiden individuellen N-SH2- und C-SH2-Liganden für SHP-1 und SHP-2. Aufgrund der Komplexität dieses Forschungsansatzes war deshalb eine Bearbeitung im Rahmen der bisherigen Forschungsarbeiten nicht möglich.

5.1 Beiträge zur Charakterisierung der minimalen Konsensussequenzen der N-SH2-Domäne

Die Kenntnis der bioaktiven Konformation eines biologisch wirksamen Moleküls ist essentiell für das rationale, strukturbasierte Design von therapeutisch interessanten Verbindungen. Viele natürlich vorkommende bioaktive Substanzen enthalten definierte Regionen (Motive) innerhalb ihres Moleküls, die die Informationen für die biologische Aktivität enthalten. Speziell im Fall von peptidischen Verbindungen hat sich dabei gezeigt, dass Untersuchungen zur bioaktiven Konformation sowohl lineare als auch cyclische Analoga erfordern, die eine stark eingeschränkte Flexibilität, aber dennoch hohe biologische Aktivität besitzen. Konformationsstabilisierte Peptide stellen demnach Analoga natürlicher Vorbilder dar, die eine bioaktive Konformation konserviert haben.

Zur Stabilisierung der bioaktiven Konformation sind verschiedene Ansätze bekannt. Konformationelle Restriktion kann beispielsweise durch den Einbau sterisch anspruchsvoller bzw. konformationell eingeschränkter Aminosäuren oder durch verschiedene Arten der Cyclisierung erfolgen.^[Anhang A: 1] Sogenannte 'turn'-Strukturen sind dabei in der Entwicklung von bioaktiven Molekülen bevorzugt, wie der erfolgreiche Einsatz cyclischer Peptide in der Entwicklung von Grb2-SH2-Inhibitoren gezeigt hat. Demnach erschien der Ansatz einer Konformationsstabilisierung für N-SH2-Liganden der Proteintyrosinphosphatase SHP-1

hinsichtlich Effektorentwicklung vielversprechend, da in Abwesenheit einer Ligand-komplexierten Kristallstrukturanalyse und über die Informationen aus dem Screening einer Peptidbibliothek hinaus keine detaillierten konformationellen und topographischen Informationen zur Ligand-SH2-Domänen-Interaktion vorlagen. In unseren Arbeiten konnten wir jedoch interessante Unterschiede zwischen linearen, superaktivierenden und cyclischen, partiell inhibierenden Verbindungen feststellen und darüber hinaus zwei verschiedene Modelle der Erkennung von Peptidliganden durch die N-SH2-Domäne vorschlagen. [Anhang A: 2-4]

Unter Verwendung der Leitsequenz um Phosphotyrosin 2267 (EGLNpYML) aus der Rezeptortyrosinkinase Ros, einem hochaffinen natürlichen Bindungspartner von SHP-1, synthetisierten wir zunächst eine Serie von Peptidliganden, die in den Positionen pY+1 und pY+3 durch nichtproteinogene Phenylalaninanaloga und konformationell eingeschränkte Aminosäuren sowie durch Seitenketten-Cyclisierung über die Positionen pY-1 und pY+2 gegenüber der Leitstruktur modifiziert waren. Hinsichtlich Synthese und analytischer Charakterisierung der Peptide gelang uns zum einen die Trennung und Aufklärung der linearen Sequenzen, in die die Aminosäuren *erythro/threo*-2-Amino-3-phenylbuttersäure (Abu(β Ph)) und *erythro/threo*-2-Amino-3-hydroxy-3-phenylpropionsäure (Ser(β Ph)) als racemische *D/L*-Mischungen eingebaut wurden. Durch Vorsäulenderivatisierung mit FDNP-*L*-Ala-NH₂ (Marfey's Reagenz) konnten die Diastereomere der Aminosäuren chromatographisch getrennt werden, so dass die Stereochemie des entsprechenden Restes in den jeweiligen Peptidfraktionen durch RP-HPLC des derivatisierten Hydrolyseproduktes bestimmt werden konnte. Zum anderen gelang uns die Synthese cyclischer Phosphopeptide über den Einbau des Monobenzyl-geschützten Phosphotyrosinbausteins, der durch die zur Cyclisierung erforderlichen Abspalt- und Kopplungsreaktionen unbeeinflusst blieb. Die für diese erste Serie an Liganden entwickelten Synthesestrategien wurden für alle weiteren Verbindungen beibehalten. [Anhang A: 2]

Die Untersuchungen zur Wirksamkeit dieser Verbindungen in einem enzymatischen Test (Phosphataseassay) und in SPR-Bindungsstudien zeigten für die linearen Vertreter, dass im Gegensatz zur weniger sterisch gehinderten Position pY+3 Aminosäurereste in pY+1 sowohl hinsichtlich Länge der Seitenkette als auch deren Modifikation strukturell eingeschränkter sind. So zeigten beispielsweise Peptide mit Hfe bzw. *L-erythro/threo*-Ser(β Ph) in pY+1 eine geringere Aktivität als vergleichbare Peptide mit Phe oder Nle in dieser Position. Die interessantesten Ergebnisse dieser Serie lieferten jedoch die cyclischen Vertreter. Um einen negativen Einfluß auf die Rückgrat- und die Seitenkettenkonformation der für die Assoziation mit der SH2-Domäne bedeutenden Aminosäuren zu verhindern, wurden die Positionen pY-1 und pY+2 für den Ringschluß gewählt, wobei Molecular Modeling Studien die Auswahl der Sequenzen, insbesondere der Ringgröße, unterstützten. Die Testung der

cyclischen Verbindungen bestätigte zum einen das theoretische Docking, denn für die Peptide mit einem Glycinrest in der Verbrückungseinheit wurde eine im Vergleich zum Leitpeptid höhere Bindungsaffinität ermittelt, während das Peptid ohne Glycin im Ring aufgrund seiner ungünstigen Konformation nicht an die N-SH2-Domäne assoziierte. Zum anderen waren die hochaffinen cyclischen Peptide im Phosphataseassay sehr viel geringer aktiv als das Leitpeptid. Aufgrund dessen untersuchten wir die Fähigkeit dieser Peptide, die SHP-1-Aktivität in Gegenwart der Leitsequenz Ros pY²²⁶⁷ zu inhibieren. Die Experimente zeigten, dass die cyclischen Peptide EGLc[K(COCH₂NH)pYMX]L-NH₂ (X = D, E) die Ros pY²²⁶⁷-vermittelte SHP-1-Aktivierung partiell inhibierten.^[Anhang A: 3]

Um der Ursache für die partielle Inhibierung durch die cyclischen Vertreter auf den Grund zu gehen, wurde eine weitere Serie von SH2-Liganden dargestellt, die in den für die Bindung an die SH2-Domäne essentiellen Positionen die optimalen Aminosäurereste, die u.a. in der ersten Serie ermittelt wurden, enthielten. Daraus resultierten im Unterschied zur ersten Serie hochaffine, superaktivierende cyclische Peptide. Mit Hilfe von Dockingexperimenten unter Verwendung der verfügbaren Kristallstrukturen von SHP-2 und SHP-1 wurden anhand der minimalen Konsensussequenzen (Klasse I und II) und der von uns generierten experimentellen Daten zwei unterschiedliche Bindungsmodi für die Peptide festgestellt. Klasse I-Peptide assoziieren an die SH2-Domäne in einer gekrümmten Konformation, während Klasse II-Liganden in gestreckter Konformation binden. Die Rückgratkonformation beeinflusst darüber hinaus die Flexibilität und damit den Interaktionsspielraum der Seitenketten. Unsere Daten lassen den Schluß zu, dass die Phosphatase nur effizient aktiviert werden kann, wenn der Aminosäurerest in Position pY+3 tief genug in die entsprechende Bindungstasche auf der Proteinoberfläche hineinragt (Klasse II-Liganden). Solche Klasse II-Liganden sind z.B. die superaktivierenden cyclischen Peptide, die die pY+3-Tasche vollständig ausfüllen. Im Gegensatz dazu aktivieren die cyclischen Klasse I-Liganden die Phosphatase nicht effizient, weil der Aminosäurerest in pY+3 mehr konformationellen Spielraum besitzt und deren Bindung somit die Konformationsänderung, die notwendig ist, um die Dissoziation der N-SH2-Domäne von der katalytischen Domäne auszulösen, nicht so effizient forciert wie die Klasse II-Liganden.^[Anhang A: 4]

Die Informationen, die wir aus den experimentellen und theoretischen Daten für die Effektorentwicklung ableiten konnten, unterstützen die Hypothese, dass eine minimale konformationsstabilisierte Peptidsequenz generiert werden kann, die eine weitaus höhere Bindungsaffinität aufweist, als native Bindungsproteine sie besitzen. Im Hinblick auf die Modulation der Phosphataseaktivität jedoch können sich solche Liganden in Abhängigkeit vom Bindungsmodus als Aktivatoren oder Inhibitoren herausstellen. Da zum gegenwärtigen Zeitpunkt eine exakte Vorhersage des Verhaltens einer solchen Verbindungen hinsichtlich

Stimulation der SHP-1-Aktivität nicht möglich ist, wurde diese Strategie konzeptionell weiterentwickelt. Die für eine hohe Bindungsaffinität erforderliche minimale konformationsstabilisierte Sequenz soll nun durch ein zweites Motiv ergänzt werden, dessen Angriffsfläche sich auf der Oberfläche der katalytischen Domäne befindet. Mit Hilfe dieses Motivs wird eine Verhinderung des Dissoziationsprozesses der N-SH2- von der katalytischen Domäne angestrebt. Das Design eines solchen bivalenten Liganden erfordert Kenntnisse über die Spezifität der Liganderkennung im Bereich C-terminal des pY+3-Restes, weshalb an dieser Stelle auf Kapitel 5.2 verwiesen wird.

Verweis auf zitierte Publikationen im Anhang A:

- [1] Reissmann, S., Imhof, D., Development of conformationally restricted analogues of bradykinin and somatostatin using constrained amino acids and different types of cyclization, (2004) *Curr. Med. Chem.* 11, 2823-2844.
- [2] Imhof, D., Nothmann, D., Zoda, M. S., Hampel, K., Wegner, J., Böhmer, F. D., and Reissmann, S., Synthesis of linear and cyclic phosphopeptides as ligands for the N-terminal SH2 domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *J. Pept. Sci.* 11, 390-400.
- [3] Imhof, D., Wieligmann, K., Hampel, K., Nothmann, D., Zoda, M. S., Schmidt-Arras, D., Zacharias, M., Reissmann, S., Böhmer, F. D., Design and biological evaluation of linear and cyclic phosphopeptide ligands of the N-terminal SH2 domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *J. Med. Chem.* 48, 1528-1539.
- [4] Hampel, K., Kaufhold, I., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Imhof, D., Phosphopeptide ligands of the SHP-1 N-SH2 domain: Effects on binding and stimulation of phosphatase activity, (2006) *ChemMedChem* 1, 869-877.

5.2 Spezifische Erkennung C-terminal der minimalen Konsensussequenzen

Die spezifische Assoziation einer SH2-Domäne an ein pY-Protein wird hauptsächlich durch das Peptidmotiv in unmittelbarer Umgebung des phosphorylierten Tyrosinrestes vermittelt. Bei der großen Mehrheit der SH2-Domänen bestimmen dabei die drei Reste C-terminal des Phosphotyrosins (Positionen +1 bis +3) die Sequenzspezifität. Die SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 unterscheiden sich bereits in der minimalen Erkennungssequenz signifikant von den klassischen SH2-Domänen, da sie eine hohe Affinität für Aminosäuren N- und C-terminal des pY-Restes aufweisen (Kapitel 3.5). Darüber hinaus häuften sich jedoch auch Hinweise auf eine zusätzliche Spezifität C-terminal der Aminosäure in Position pY+3, die mitunter zu einer 2-5fach erhöhten Bindungsaffinität der verlängerten Peptide gegenüber den minimalen Konsensussequenzen führten. Zur systematischen Aufklärung der Bindungsspezifitäten der N- und C-terminalen SH2-Domänen beider Phosphatasen verwendeten wir aus diesem Grund eine Technik, die das Screening einer kombinatorischen Peptidbibliothek mit der Identifizierung der SH2-gebundenen Sequenzen über partiellen

EDMAN-Abbau/MALDI-TOF-Massenspektrometrie (PED/MS) effizient miteinander verbindet.^[Anhang A: 5]

Unsere Daten erlauben die Schlußfolgerung, dass für die SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 die Aminosäuren in den Positionen pY+4 und pY+5 des Liganden Teil der spezifischen Erkennung sind. Die Größe einer effizient an SHP-1 bzw. SHP-2 bindenden Peptidsequenz umfaßt somit die Positionen pY-2 bis pY+5 (hXpYhXh(h/b)(h/b), h = hydrophobe Aminosäure, b = basische Aminosäure, X = beliebige Aminosäure). Wir konnten außerdem feststellen, dass zwischen SHP-1 und SHP-2, die hinsichtlich ihrer minimalen Konsensussequenzen überlappende Spezifitäten aufweisen, subtile Spezifitätsunterschiede in pY+4 bis pY+6 bestehen. Generell sind hydrophobe und/oder basische Reste C-terminal von pY+3 bevorzugt, wobei bestimmte Motive eine sehr starke Sequenzkovarianz besitzen, wie z.B. WYG, WHR und MFP. Die SHP-1 N-SH2-Domäne bevorzugt große hydrophobe Reste (W, Y, F, L oder I) oder positiv geladene Aminosäuren (R, K oder H) in pY+4, während in pY+5 die positiv geladenen R, K und H gegenüber den hydrophoben Aminosäuren W, Y, F und P bevorzugt sind. Die N-SH2-Domäne von SHP-2 ist ebenfalls sehr spezifisch für hydrophobe aromatische Reste (W, Y und F) in pY+4 und pY+5 des Liganden. Ein großer Unterschied zwischen beiden Proteinmodulen ist, dass SHP-2 N-SH2 keine positiv geladenen Reste in pY+4 und pY+5 mit Ausnahme von Histidin bevorzugt. Dieser Sachverhalt kann anhand der Kristallstrukturen von SHP-1 und SHP-2 erklärt werden. Prinzipiell kann die relativ breite Bindungstasche für pY+4 und pY+5, die durch die α -Helix B (Boden der Tasche) und die EF- und BG-Schleifen (Wände der Tasche) gebildet wird, eine Vielzahl von Aminosäuren aufnehmen. Die Seitenketten von Arginin und Lysin können in hydrophobe Wechselwirkungen mit der Proteinoberfläche involviert sein. Zusätzlich können ihre positiv geladenen Gruppen mit negativ geladenen Resten in der SH2-Domäne interagieren. Im Fall von SHP-1 enthält der BG-Loop das negativ geladene Motiv LQDRDG, während die entsprechende Sequenz in SHP-2 LKEKNG ist.

Die von uns spezifizierte C-terminale Sequenzsignatur der SH2-Domänen von SHP-1 und SHP-2 besitzt auch physiologische Relevanz, denn 52% der bekannten Interaktionspartner beider Phosphatasen enthalten einen hydrophoben Rest in pY+5, wovon in wiederum 37% der Proteine Phenylalanin oder Tyrosin auftreten. Beide Aminosäuren waren außerdem die am häufigsten in dieser Position auftretenden Reste in den über die Peptidbibliothek ermittelten Sequenzen. Weiterhin findet man in 22% der nativen Bindungsproteine eine positiv geladene Aminosäure in pY+5. In Position pY+4 weisen ebenfalls ca. 45% der Interaktionsmotive einen hydrophoben oder positiv geladenen Rest auf. Interessanterweise, binden 13 der 54 bekannten humanen Bindeproteine spezifisch an SHP-1 und 18 ausschließlich an SHP-2. Die Sequenz C-terminal von pY+3 ist im Falle der 13 SHP-1-

Interaktionspartner von positiv geladenen Resten dominiert, was wahrscheinlich auf die oben erläuterte spezifische Interaktion mit der BG-Schleife zurückzuführen ist.

Verweis auf zitierte Publikation im Anhang A:

- [5] Imhof, D., Wavreille, A.-S., May, A., Zacharias, M., Tridandapani, S., Pei, D., Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 SH2 domains: Critical roles of residues beyond the pY+3 position. *J. Biol. Chem.* 2006, 281, 20271-20282.

5.3 Beiträge zur Charakterisierung von SHP-1-Substraten

Im Unterschied zur Liganderkennung durch die SH2-Domänen wird die Substratspezifität der katalytischen Domäne primär durch die Aminosäuren N-terminal des Phosphotyrosinrestes bestimmt. Untersuchungen in HEK293 Zellen zeigten, dass SHP-1 effizient Src-abhängigen Phosphorylierungen entgegenwirkt.^[Anhang A: 6] SHP-1 wird dabei zunächst durch die Src-Kinase über Tyrosinphosphorylierung(en) in der C-terminalen Region aktiviert, um dann andere, durch Src phosphorylierte Proteine zu dephosphorylieren. Die Substratspezifität beider Proteine ist komplementär, d.h. Substrate, die durch Src phosphoryliert werden, werden durch SHP-1 effizient dephosphoryliert. Das optimale, phosphorylierte Src-Substrat AEEElpYGEFEA und das Phosphopeptid DDLDPYGMMSD, das der Src-Phosphorylierungsstelle Y²⁹⁶ in p120-Catenin entspricht, wurden als exzellente SHP-1-Substrate identifiziert. Im Ergebnis dieser Untersuchungen wurde deshalb vorgeschlagen, dass bei Anwesenheit von SHP-1 durch Src ausgelöste intrazelluläre Signale nur von kurzer Dauer sind. Bei den beiden genannten Substraten handelt es sich um monophosphorylierte Sequenzen. Einige Gruppen hatten jedoch gezeigt, dass PTPs mehrfach phosphorylierte Substrate sehr viel besser erkennen und effizienter dephosphorylieren als monophosphorylierte Verbindungen. Für die Entwicklung von Effektoren für SHP-1, die gegen die katalytische Domäne gerichtet sind (Kapitel 5, Strategie d), genügten demnach Informationen, die aus Untersuchungen an einzelnen Substraten vorgenommen wurden, nicht aus, um eine Vorstellung über die Substraterkennung zu erlangen. Aus diesem Grund wurden zwei weitere Studien angestrebt, die der Aufklärung der sequenzabhängigen Dephosphorylierung Phosphotyrosin-enthaltender Peptide durch SHP-1 dienten. Zum einen untersuchten wir die zeitabhängige Dephosphorylierung tri-, bi- und monophosphorylierter Peptide der aus dem Aktivierungsloop der Rezeptortyrosinkinase Ros abgeleiteten Sequenz AREIYKNDYYRKRGEg durch die Phosphatasen PTP1B und SHP-1,^[Anhang A: 7] und zum anderen verwendeten wir eine Phosphonomethylphenylalanin (Pmp)-enthaltende Peptidbibliothek für ein Screening gegen SHP-1.^[Anhang A: 8]

Mit Hilfe von HPLC und MALDI-TOF-Massenspektrometrie waren wir in der Lage, die Dephosphorylierung der mono-, bi- und triphosphorylierten Formen der aus dem

Aktivierungsloop der Rezeptortyrosinkinase Ros abgeleiteten Sequenz AREIY⁵KNDY⁹Y¹⁰RVGG zeitabhängig zu untersuchen. Wir konnten u.a. zeigen, dass die triphosphorylierten Sequenzen sowohl von SHP-1 als auch von PTP1B, dem Prototyp der Proteintyrosinphosphatasen, schneller erkannt und dephosphoryliert werden als die bi- und monophosphorylierten Peptide. Außerdem lieferten wir den Nachweis, dass im Falle der benachbarten Tyrosinreste bevorzugt pY¹⁰ statt pY⁹ dephosphoryliert wird, was in der Literatur bis dahin kontrovers diskutiert wurde. Unsere Daten bestätigten auch die bereits vorgeschlagene Präferenz von SHP-1 für die Sequenz R(D/E)(V/I)pYXX(D/E)YpY gegenüber dem (D/E)XpY-Motiv oder monophosphorylierten Substraten im allgemeinen. Dieses Motiv ist in verschiedenen SHP-1-Substraten vorhanden, wie die Beispiele TrkA und Ros zeigen (Tabelle 2). Diese Sequenzen werden jedoch auch von PTP1B effizient dephosphoryliert. Dabei ist PTP1B hinsichtlich der Position pY-2 im Vergleich zu SHP-1 unspezifischer, da SHP-1 beispielsweise die monophosphorylierte Variante AREIYKNDpYYRKRG der Rezeptortyrosinkinase Ros unter den angewandten Bedingungen im Unterschied zu PTP1B nicht dephosphorylierte, was auf die Unterschiede der durch die Substratbindung ausgelöste Konformationsänderung der WPD-Schleife (Kapitel 3.4) im aktiven Zentrum zurückzuführen ist. ^[Anhang A: 7]

In einer weiteren Untersuchung, in der wir SHP-1 als Vergleichsenzym hinsichtlich der Bindung und Umsetzung Phosphotyrosin-enthaltender Peptide einsetzten, konnten wir mit Hilfe des Screenings einer Peptidbibliothek zeigen, dass das für die Substratumsetzung essentielle Motiv (D/E)XpY auch in an die katalytische Domäne assoziierenden Peptiden gehäuft gefunden wird. Die Peptidbibliothek (X)₄PmP(X)₄ (X = proteinogene Aminosäuren außer Met und Cys, inklusive Nle) enthielt dabei das nicht hydrolysierbare Phosphonomethylphenylalanin anstelle des Phosphotyrosinrestes, um die Detektion mit Hilfe der bereits erwähnten PED/-MS-Methode zu ermöglichen. Im Fall von SHP-1 unterscheiden sich dabei an die katalytische Domäne bindende Sequenzen nicht von optimalen Substraten. ^[Anhang A: 8]

Verweis auf zitierte Publikationen im Anhang A:

- [6] Frank, C., Burkhardt, C., **Imhof, D.**, Ringel, J., Zschörnig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., **Böhmer, F. D.**, Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1. *J. Biol. Chem.* 2004, 279, 11375-11383.
- [7] Teichmann, K., Winkler, R., Hampel, K., Trümpler, A., Böhmer, F. D., **Imhof, D.**, Dephosphorylation of a multisite phosphorylated segment from receptor tyrosine kinase Ros by SHP-1 and PTP1B. *J. Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 2007, 853, 204-213.
- [8] Musharraf, A., Marksches, N., Englert, C., and **Imhof, D.**, Eyes absent proteins: characterization of substrate specificity and phosphatase activity of mutants associated with branchial, otic and renal anomalies, *ChemBioChem*, in revision.

Tabelle 2. Bekannte* und vorgeschlagene** Substrate für SHP-1 und PTP1B

Protein	Sequenz	Referenzen
<i>SHP-1*</i>		
Lck	EDNEY ³⁹⁴ TARE	109, 228
Fyn	EDNEY ⁴²⁰ TARQ	109
Lyn	EDNEY ³⁹⁷ TARE, TEGQY ⁵⁰⁸ QQQP	229
p85 PI3K	PYNLY ⁶⁸⁸ SSLK	230
SLP-76	EEDDY ¹¹³ ESPN, DDGDY ¹²⁸ ESPN, DDADY ¹⁴⁵ EP PP	134
hER	VVPLY ⁵³⁷ DLLL	231
FcεRIβ (ITAM)	DDRLYEELHVYSPIYSALE,	232
FcεRIγ (ITAM)	SDAVY ⁶⁵ TGLNTRNQETY ⁷⁶ ETLK	
RAFTK	ESDIY ⁴⁰² AEIP	133
HoxA10	KRCPY ³²⁶ TKHQ, LFNMY ³⁴³ LTRE	233
Vav1	_DEIY ¹⁷⁴ EDL_	234
TrkA	SRDIYSTDY ⁶⁷⁴ Y ⁶⁷⁵ RVGG	137
Ros	AREIY ²⁰⁰³ KNDY ²⁰⁰⁷ Y ²⁰⁰⁸ RKRG	66
p120 ^{ctn}	DDL DY ²⁹⁶ GMMSD	Anhang A: 6
<i>PTP1B*</i>		
Erk2	FLTEY ¹⁸⁷ VATR	235
PDGFβ-R	SDGGY ⁷⁴⁰ MDMS, ESDY ⁷⁵¹ VPML, ESSNY ⁷⁷¹ MOPY, SSVLY ¹⁰⁰⁹ TAVQ GDNDY ¹⁰²¹ IIPL	236
EGFR	DADEY ⁹⁹² LIPQ	237
IR	TRDIY ¹¹⁵⁸ ETDY ¹¹⁶² Y ¹¹⁶³ RKGG	240, 241
Jak2	QDKEY ¹⁰⁰⁷ Y ¹⁰⁰⁸ KVKE	238
Tyk2	EGHEY ¹⁰⁵⁴ Y ¹⁰⁵⁵ RVRE	238
STAT5A	VFSKY ⁶⁸² Y ⁶⁸³ TPVL	239
STAT5B	KDEVY ⁶⁷⁹ SKY ⁶⁸² Y ⁶⁸³ TPVP	239
<i>Ausgewählte Proteine mit dem YXXXY Motif**</i>		
HGFR	ARDMY ¹²³⁰ DKEY ¹²³⁴ Y ¹²³⁵ SVHN	
IGFR-1	TRDIY ¹¹⁶¹ ETDY ¹¹⁶⁵ Y ¹¹⁶⁶ RKGG	241
IRR	TRDVY ¹¹⁴¹ ETDY ¹¹⁴⁵ Y ¹¹⁴⁶ RKGG	241
LTK	ARDIY ⁶¹¹ RASY ⁶¹⁵ Y ⁶¹⁶ RRGD	
Trk-A	SRDIY ⁶⁷⁶ STDY ⁶⁸⁰ Y ⁶⁸¹ RVGG	241
Trk-B	SRDVY ⁷¹⁸ STDY ⁷²² Y ⁷²³ RVGG	241
Trk-C	SRDVY ⁷⁰⁵ STDY ⁷⁰⁹ Y ⁷¹⁰ RVGG	241
PTK7-R	SKDVY ⁹⁵⁶ NSEY ⁹⁶⁰ Y ⁹⁶¹ HFRQ	
Myosin-15	PYDYY ²⁸³ HPDY ²⁸⁷ Y ²⁸⁸ GGPF	
ROR1	SREIY ⁶⁴¹ SADY ⁶⁴⁵ Y ⁶⁴⁶ RVQS	
ROR2	FREYV ⁶⁴¹ AADY ⁶⁴⁵ Y ⁶⁴⁶ KLLG	
Collagen α1 chain	SVDYR ¹⁴¹⁵ KVEY ¹⁴¹⁹ Y ¹⁴²⁰ PVSG	
NT-3-GFR (BDNF)	SRDVY ⁷⁰⁵ STDY ⁷⁰⁹ Y ⁷¹⁰ RLFN	

5.4 Perspektiven für die Entwicklung von Effektoren für SHP-1

Im Zusammenhang mit den in der Literatur beschriebenen (Kapitel 4.1, 4.2) sowie aus unseren Arbeiten gewonnenen Erkenntnissen (Kapitel 5.1-5.3) werden von uns aktuell zwei Strategien hinsichtlich der Entwicklung von Effektoren der SHP-1-Phosphataseaktivität forciert. In Anlehnung an Strategie (a) werden derzeit monovalente SH2-Liganden synthetisiert, die zwei wichtige Eigenschaften in sich vereinen: 1) die essentiellen Komponenten zur Erkennung durch die N-SH2-Domäne und 2) einen konformationsstabilisierenden Cyclus zur Einschränkung der Flexibilität des Peptidrückgrates. Letzteres hatte, wie bereits beschrieben, zu partiell inhibierenden Liganden (Kapitel 5.1) geführt, was an einer weiteren Serie cyclischer Verbindungen noch verbessert werden soll. Die Variabilität der generierten Strukturen wird dabei von reinen Seitenketten-cyclisierten Peptiden auf Rückgrat-Seitenketten-cyclisierte Peptide erweitert, da Molecular Modeling-Studien gezeigt haben, dass auch das Einbeziehen des Phosphotyrosinrestes in den Cyclus zu ausgesprochen effizient bindenden Liganden führen sollte. Dies kann durch den Einbau eines N^α-funktionalisierten Phosphotyrosinrestes erfolgen, dessen Herstellung und Einbau bereits erprobt wurde.^[Anhang A: 9] Dennoch können in Abhängigkeit von der konformationell veränderten Situation in den Positionen pY, pY+1 und pY+3 sowohl nicht bindende als auch hochaffine aktivierende Substanzen anstelle der angestrebten Inhibitoren resultieren. Aus diesem Grund generieren wir parallel zu Strategie (a) eine Serie von bivalenten Liganden der Strategie (c), weil aufgrund der in Kapitel 5.2 beschriebenen Untersuchungen zwischenzeitlich die Informationen für die Gestaltung der Region C-terminal der Position pY+3 für eine spezifische und hochaffine Assoziation vorliegen.

Verweis auf zitierte Publikation im Anhang A:

- [9] Veröffentlicht im Rahmen des 28. Europäischen Peptidsymposiums, Prag, September 2004: **Imhof, D.**, Niksch, T., Zoda, M. S., Teichmann, K., Fabisch, C., Erdsack, J., Reissmann, S., Synthetic strategies to backbone-side chain cyclic peptides containing N^α-functionalized phosphotyrosine; In: *Peptides 2004* (Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J., eds.), Kenes International, Geneva, Switzerland, electronic version.

6 ZUSAMMENFASSUNG

Die selektive Hemmung von Enzymen der intrazellulären Signalkaskaden ist ein aktuelles Ziel in der Entwicklung neuer Behandlungsmöglichkeiten für zahlreiche pathophysiologische Zustände, wie z.B. chronische Entzündungen, neurodegenerative Erkrankungen und verschiedene Krebserkrankungen. Obwohl klassische Inhibitoren auf eine Blockierung des aktiven Zentrums abzielen und damit zweifellos die Inhibierung des entsprechenden Enzyms herbeiführen, sind sie aufgrund der Sequenz- und Strukturhomologie innerhalb bestimmter Enzymfamilien meist ausgesprochen unspezifisch und finden somit nur beschränkt Anwendung. In neueren Ansätzen wird dagegen angestrebt, Bindungsstellen außerhalb des aktiven Zentrums zu attackieren, die z.B. auf Proteinmodulen in der Nähe der katalytischen Domäne zu finden sind. Die Forschung auf diesem Gebiet profitiert häufig von dreidimensionalen Strukturdaten, die zur Identifizierung individueller Regionen oder Dockingstellen auf dem Zielmolekül herangezogen werden können und darüber in die Regulation der Substratinteraktion eingebunden werden.

Die SH2-Domänen der Proteintyrosinphosphatase SHP-1, insbesondere die N-terminale SH2-Domäne, sind aufgrund ihrer Beteiligung an der allosterischen Regulation der Enzymaktivität in besonderem Maße für die Entwicklung von Effektoren interessant. Ziel der vorliegenden Arbeit war es deshalb, über die Kenntnis der minimalen Konsensussequenzen hinaus eine detaillierte Analyse der topographischen und konformationellen Erfordernisse zur spezifischen Bindung an die SHP-1 N-SH2-Domäne vorzunehmen und davon ausgehend Konzepte für die gezielte Modulation der Phosphataseaktivität zu erarbeiten.

Die Strategien zur Regulation der Phosphatase wurden aufgrund der Domänenstruktur des Enzyms abgeleitet, da diese verschiedene Möglichkeiten des Angriffs durch niedermolekulare Verbindungen bietet. Neben einer detaillierten Analyse der Determinanten zur hochaffinen Bindung an N-SH2 sowie zur Aktivierung bzw. Inhibierung von SHP-1 mit Hilfe konformationell eingeschränkter minimaler Konsensuspeptide konnte ein wichtiger Beitrag zur Klärung der Frage nach der Bedeutung der Aminosäurereste C-terminal der minimalen Konsensussequenz geleistet werden. Letzteres war essentiell für die aktuellen Untersuchungen bivalenter Liganden, die neben der SH2-Erkennungssequenz ein weiteres Motiv enthalten, dass zur Interaktion mit einer unabhängigen Bindungsstelle in der Nähe der N-SH2/PTP-Kontaktfläche vorgesehen ist. Im Bezug auf substratanaloge Verbindungen konnte anhand von kinetischen Untersuchungen gezeigt werden, dass bestimmte Motive mit drei phosphorylierten Tyrosinresten gegenüber mono- oder biphosphorylierten Sequenzen bevorzugt durch SHP-1 umgesetzt werden. Die Kenntnis der Lokalisierung der Phosphotyrosinreste und der strukturellen Eigenschaften der weiteren Aminosäuren

innerhalb dieses Motivs beeinflusst folglich das Design von Effektoren der katalytischen Domäne.

Die aus unseren Untersuchungen gewonnenen Informationen sind für die weitere Entwicklung spezifischer Inhibitoren der Proteintyrosinphosphatase SHP-1 wesentlich, da wir die molekulare Erkennung von SH2-Liganden sowie von Substraten für die katalytische Domäne präzisieren konnten. Im Hinblick auf die Intervention der SH2-Domänen-Interaktionen kann die Sequenz- und Strukturhomologie zur verwandten SHP-2 limitierend sein, obwohl SHP-1 seine N-SH2-Liganden spezifischer erkennt als SHP-2. Aus unserer Sicht sollte eine solche Unterscheidung zwischen beiden Phosphatasen auf der Ebene der C-terminal verlängerten Konsensussequenzen (>pY+3) dennoch möglich sein. Bezüglich reiner substratanaloger Verbindungen ist die Entwicklung aufgrund der geringeren Spezifität von PTP1B ebenfalls gehemmt. Eine Kopplung von hochspezifischen SH2-Liganden mit substratanalogen Motiven bzw. mit den von uns angestrebten Motiven, die nicht im aktiven Zentrum binden, wird deshalb als Ausgangspunkt für weitere Untersuchungen vorgeschlagen. Studien an hochspezifischen peptidischen Verbindungen erleichtern perspektivisch das rationale Design von niedrigmolekularen Effektoren für SHP-1.

7 LITERATUR

1. Johnson, L. N., Barford, D., The effects of phosphorylation on the structure and function of proteins., (1993) *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 22, 199-232.
2. a) Tonks, N. K., Neel, B. G., From form to function: signaling by protein tyrosine phosphatases, (1996) *Cell* 87, 365-368. b) Tonks, N. K., Neel, B. G., Combinatorial control of the specificity of protein tyrosine phosphatases, (2001) *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 182-195.
3. Östman, A., Böhmer, F.-D., Regulation of receptor tyrosine kinase signaling by protein tyrosine phosphatases, (2001) *TRENDS in Cell Biology* 11, 258-266.
4. Haugh, J. M., Schneider, I. C., Lewis, J. M., On the cross-regulation of protein tyrosine phosphatases and receptor tyrosine kinases in intracellular signaling, (2004) *J. Theor. Biol.* 230, 119-132.
5. Shen, S.-H., Bastien, L., Posner, B. L., Chretien, P., A protein-tyrosine phosphatase with sequence similarity to the SH2 domain of the protein-tyrosine kinases, (1991) *Nature* 352, 736-739.
6. Frearson, J. A., Alexander, D. R., The role of phosphotyrosine phosphatases in haematopoietic cell signal transduction, (1997) *BioEssays* 19, 417-427.
7. a) Shultz, L. D., Schweitzer, P. A., Rajan, T. V., Yi, T., Ihle, J. N., Matthews, R. J., Thomas, M. L., Beier, D. R., Mutations at the motheaten locus are within the hematopoietic-cell protein-tyrosine-phosphatase (Hcph) gene, (1993) *Cell* 73, 1445-1454. b) Tsui, H. W., Siminovitch, K. A., de Souza, L., Tsui, F. W., Motheaten and viable motheaten mice have mutations in the hematopoietic cell phosphatase gene, (1993) *Nat. Genet.* 4, 124-129.
8. Green, M. C., Shultz, L., D., Motheaten, an immunodeficient mutant of the mouse, (1975) *J. Hered.* 66, 250-258.
9. a) Kruger, J., Butler, J. R., Cherapanov, V., Dong, Q., Ginzberg, H., Govindarajan, A., Grinstein, S., Siminovitch, K. A., Downey, G. P., Deficiency of Src homology 2-containing phosphatase 1 results in abnormalities in murine neutrophil function: studies in motheaten mice, (2000) *J. Immunol.* 165, 5847-5859. b) Tsui, F. W. L., Martin, A., Wang, J., Tsui, H. W., Investigations into the regulation and function of the SH2 domain-containing protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (2006) *Immunol. Res.* 35, 127-136.
10. Smithgall, T. E., Signal transduction pathways regulating hematopoietic differentiation, (1998) *Pharmacol. Rev.* 50, 1-19.
11. Zhang, J., Somani, A.-K., Siminovitch, K. A., Roles of the SHP-1 tyrosine phosphatase in the negative regulation of cell signalling, (2000) *Semin. Immunol.* 12, 361-378.
12. Isakov, N., Immunoreceptor tyrosine-based activation motif (ITAM), a unique module linking antigen and Fc receptors to their signaling cascades, (1997) *J. Leukoc. Biol.* 61, 6-16.
13. Pani, G., Kozlowski, M., Cambier, J. C., Mills, G. B., Siminovitch, K. A., Identification of the tyrosine phosphatase PTP1C as a B cell antigen receptor-associated protein involved in the regulation of B cell signaling, (1995) *J. Exp. Med.* 181, 2077-2084.
14. Wu, Y., Pani, G., Siminovitch, K., Hozumi, N., Antigen receptor-triggered apoptosis in immature B cell lines is associated with the binding of a 44 kDa phosphoprotein to the PTP1C tyrosine phosphatase, (1995) *Eur. J. Immunol.* 25, 2279-2284.
15. Wu, Y., Nadler, M. J., Brennan, L. A., Gish, G. D., Timms, J. F., Fusaki, N., Jongstra-Bilen, J., Tada, N., Pawson, T., Wither, J., Neel, B. G., Hozumi, N., The B-cell transmembrane protein CD72 binds to and is an in vivo substrate of the protein tyrosine phosphatase SHP-1, (1998) *Curr. Biol.* 8, 1009-1017.

16. Ono, M., Okada, H., Bolland, S., Yangai, S., Kurosaki, T., Ravetch, J. V., Deletion of SHIP or SHP-1 reveals two distinct pathways for inhibitory signaling, (1997) *Cell* 90, 293-301.
17. Bolland, S., Ravetch, J. V., Inhibitory pathways triggered by ITIM-containing receptors, (1999) *Adv. Immunol.* 72, 149-177.
18. Cambier, J. C., Inhibitory receptors abound?, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5993-5995.
19. Thomas, M. L., Of ITAMs and ITIMs: turning on and off the B cell antigen receptor, (1995) *J. Exp. Med.* 181, 1953-1956.
20. Pani, G., Fischer, K. D., Mlinaric-Rascan, I., Siminovitch, K. A., Signaling capacity of the T cell antigen receptor is negatively regulated by the PTP1C tyrosine phosphatase, (1996) *J. Exp. Med.* 184, 839-852.
21. Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Burakoff, S. J., Neel, B. G., Lack of SHPTP1 results in src-family kinase hyperactivation and thymocyte hyperresponsiveness, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 9624-9629.
22. Zhang, J., Somani, A. K., Yuen, D., Yang, Y., Love, P. E., Siminovitch, K. A., Involvement of the SHP-1 tyrosine phosphatase in regulation of T cell selection, (1999) *J. Immunol.* 163, 3012-3021.
23. Plas, D. R., Williams, C. B., Kersh, G. J., White, L. S., White, J. M., Paust, S., Ulyanova, T., Allen, P. M., Thomas, M. L., The tyrosine phosphatase SHP-1 regulates thymocyte positive selection, (1999) *J. Immunol.* 162, 5680-5684.
24. Plas, D. R., Johnson, R., Pingel, J. T., Matthews, R. J., Dalton, M., Roy, G., Chan, A. C., Thomas, M. L., Direct regulation of ZAP-70 by SHP-1 in T cell antigen receptor signaling, (1996) *Science* 272, 1173-1176.
25. Su, X., Zhou, T., Wang, Z., Yang, P., Jopes, R. S., Mountz, J. D., Defective expression of hematopoietic cell protein tyrosine phosphatase (HCP) in lymphoid cells blocks Fas-mediated apoptosis, (1995) *Immunity* 2, 353-362.
26. Krautwald, S., Buscher, D., Kummer, V., Buder, S., Baccarini, M., Involvement of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in ras-mediated activation of the mitogen-activated protein kinase pathway, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 5955-5963.
27. Mingari, M. C., Moretta, A., Moretta, L., Regulation of KIR expression in human T cells: a safety mechanism that may impair protective T-cell responses, (1998) *Immunol. Today* 19, 153-157.
28. Clements, J. L., Yang, B., Ross-Barta, S. E., Eliason, S. L., Hrstka, R. F., Williamson, R. A., Koretzky, G. A., Requirement for the leukocyte-specific adapter protein SLP-76 for normal T cell development, (1998) *Science* 281, 416-419.
29. Kon-Kozlowski, M., Pani, G., Pawson, T., Siminovitch, K. A., The tyrosine phosphatase PTP1C associates with Vav, Grb2, and mSos1 in hematopoietic cells, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 3856-3862.
30. Newton-Nash, D. K., Newman, P. J., A new role for platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 (CD31): inhibition of TCR-mediated signal transduction, (1999) *J. Immunol.* 163, 682-688.
31. Migone, T. S., Cacalano, N. A., Taylor, N., Yi, T., Waldmann, T. A., Johnston, J. A., Recruitment of SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 to the interleukin 2 receptor: loss of SHP-1 expression in human T-lymphotropic virus-type 1-transformed T cells, (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 3845-3850.
32. Valiante, N. M., et al., Killer cell inhibitory receptor recognition of human leukocyte antigen (HLA) class I blocks formation of a pp36/PLC γ signaling complex in human natural killer (NK) cells, (1996) *J. Exp. Med.* 184, 2243-2250.

33. a) Leibson, P. J., Signal transduction during natural killer cell activation: inside the mind of a killer, (1997) *Immunity* 6, 655-661. b) Brumbaugh, K. M., Binstadt, B. A., Leibson, P. J., Signal transduction during NK cell activation: balancing opposing forces, (1998) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 230, 103-122.
34. Burshtyn, D. N., Scharenberg, A. M., Wagtmann, N., Rajagopalan, S., Berrada, K., Yi, T., Kinet, J. P., Long, E. O., Recruitment of tyrosine phosphatase HCP by the killer cell inhibitor receptor, (1996) *Immunity* 4, 77-85.
35. Campbell, K. S., Dessing, M., Lopez-Botet, M., Cella, M., Colonna, M., Tyrosine phosphorylation of a human killer inhibitory receptor recruits protein tyrosine phosphatase 1C, (1996) *J. Exp. Med.* 184, 93-100.
36. Gupta, N., Scharenberg, A. M., Burshtyn, D. N., Wagtmann, N., Lioubin, M. N., Rohrschneider, L. R., Kinet, J. P., Long, E. O., Negative signaling pathways of the killer cell inhibitory receptor and Fc gamma RIIb1 require distinct phosphatases, (1997) *J. Exp. Med.* 186, 473-478.
37. a) Colonna, M., et al., A common inhibitory receptor for major histocompatibility complex class I molecules on human lymphoid and myelomonocytic cells, (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1809-1818. b) Le Drian, E., Vely, F., Olcese, L., Cambiaggi, A., Guia, S., Krystal, G., Gervois, N., Moretta, A., Jotereau, F., Vivier, E., Inhibition of antigen-induced T cell response and antibody-induced NK cell cytotoxicity by NKG2A: association of NKG2A with SHP-1 and SHP-2 protein-tyrosine phosphatases, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28, 264-276.
38. Wang, L. L., Blasioli, J., Plas, D. R., Thomas, M. L., Yokoyama, W. M., Specificity of the SH2 domains of SHP-1 in the interaction with the immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing receptor gp49B, (1999) *J. Immunol.* 162, 1318-1323.
39. Brumbaugh, K. M., Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Schoon, R. A., Dick, G. J., Ten, R. M., Leibson, P. J., Functional role for Syk tyrosine kinase in natural killer cell-mediated natural cytotoxicity, (1997) *J. Exp. Med.* 186, 1965-1974.
40. Downey, G. P., Fukushima, T., Fialkow, L., Waddell, T. K., Intracellular signaling in neutrophil priming and activation, (1995) *Semin. Cell Biol.* 6, 345-356.
41. Ptasznik, A., Prossnitz, E. R., Yoshikawa, D., Smrcka, A., Traynor-Kaplan, A. E., Bokoch, G. M., A tyrosine kinase signaling pathway accounts for the majority of phosphatidylinositol 3,4,5-triphosphate formation in chemoattractant-stimulated human neutrophils, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 25204-25207.
42. Corey, S., Eguinoa, A., Puyana-Theall, K., Bolen, J. B., Cantley, L., Mollinedo, F., Jackson, T. R., Hawkins, P. T., Stephens, L. R., Granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulates both association and activation of phosphoinositide 3OH-kinase and src-related tyrosine kinase(s) in human myeloid derived cells, (1993) *EMBO J.* 12, 2681-2690.
43. Asahi, M., Taniguchi, T., Hashimoto, E., Inazu, T., Maeda, H., Yamamura, H., Activation of protein-tyrosine kinase p72syk with concanavalin A in polymorphonuclear neutrophils, (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2334-2338.
44. Dong, Q., Siminovitch, K. A., Fialkow, L., Fukushima, T., Downey, G. P., Negative regulation of myeloid cell proliferation and function by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase-1, (1999) *J. Immunol.* 162, 3220-3230.
45. Roach, T. I., Slater, S. E., White, L. S., Zhang, X., Majerus, P. W., Brown, E. J., Thomas, M. L., The protein tyrosine phosphatase SHP-1 regulates integrin-mediated adhesion of macrophages, (1998) *Curr. Biol.* 8, 1035-1038.
46. Paulson, R. F., Vesely, S., Siminovitch, K. A., Bernstein, A., Signaling by the W/Kit receptor tyrosine kinase is negatively regulated in vivo by the protein tyrosine phosphatase Shp1, (1996) *Nat. Genet.* 13, 309-315.

47. Jiao, H., Yang, W., Berrada, K., Tabrizi, M., Shultz, L., Yi, T., Macrophages from motheaten and viable motheaten mutant mice show increased proliferative responses to GM-CSF: detection of potential HCP substrates in GM-CSF signal transduction, (1997) *Exp. Hematol.* 25, 592-600.
48. Chen, H. E., Chang, S., Trub, T., Neel, B. G., Regulation of colony-stimulating factor 1 receptor signaling by the SH2 domain-containing tyrosine phosphatase SHPTP1, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 3685-3697.
49. Yi, T., Mui, A. L., Krystal, G., Ihle, J. N., Hematopoietic cell phosphatase associates with the interleukin-3 (IL-3) receptor beta chain and down-regulates IL-3-induced tyrosine phosphorylation and mitogenesis, (1993) *Mol. Cell. Biol.* 13, 7577-7586.
50. Yang, W., Tabrizi, M., Berrada, K., Yi, T., SHP-1 phosphatase C-terminus interacts with novel substrates p32/p30 during erythropoietin and interleukin-3 mitogenic responses, (1998) *Blood* 91, 3746-3755.
51. Jiao, H., Berrada, K., Yang, W., Tabrizi, M., Platanias, L. C., Yi, T., Direct association with and dephosphorylation of Jak2 kinase by the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 6985-6992.
52. Timms, J. F., Carlberg, K., Gu, H., Chen, H., Kamatkar, S., Nadler, M. J., Rohrschneider, L. R., Neel, B. G., Identification of major binding proteins and substrates for the SH2-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages, (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 3838-3850.
53. Kubagawa, H., Burrows, P. D., Cooper, M. D., A novel pair of immunoglobulin-like receptors expressed by B cells and myeloid cells, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 5261-5266.
54. Fanger, N. A., Cosman, D., Peterson, L., Braddy, S. C., Maliszewski, C. R., Borges, L., The MHC class I binding proteins LIR-1 and LIR-2 inhibit Fc receptor-mediated signaling in monocytes, (1998) *Eur. J. Immunol.* 28, 3423-3434.
55. Katz, H. R., Vivier, F., Castells, M. C., McCormick, M. J., Chambers, J. M., Austen, K. F., Mouse mast cell gp49B1 contains two immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs and suppresses mast cell activation when coligated with the high-affinity Fc receptor for IgE, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 10809-10814.
56. Lu-Kuo, J. M., Joyal, D. M., Austen, K. F., Katz, H. R., gp49B1 inhibits IgE-initiated mast cell activation through both immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs, recruitment of src homology 2 domain-containing phosphatase-1, and suppression of early and late calcium mobilization, (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 5791-5796.
57. Fujioka, Y., Matozaki, T., Noguchi, T., Iwamatsu, A., Yamao, T., Takahashi, N., Tsuda, M., Takada, T., Kasuga, M., A novel membrane glycoprotein, SHPS-1, that binds the SH2-domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-2 in response to mitogens and cell adhesion, (1996) *Mol. Cell. Biol.* 16, 6887-6899.
58. Timms, J. F., Swanson, K. D., Marie-Cardine, A., Raab, M., Rudd, C. E., Schraven, B., Neel, B. G., SHPS-1 is a scaffold for assembling distinct adhesion-regulated multi-protein complexes in macrophages, (1999) *Curr. Biol.* 9, 927-930.
59. Sano, S., Ohnishi, H., Omori, A., Hasegawa, J., Kubota, M., BIT, an immune antigen receptor-like molecule in the brain, (1997) *FEBS Lett.* 411, 327-334.
60. Veillette, A., Thibaudau, E., Latour, S., High expression of inhibitory receptor SHPS-1 and its association with protein-tyrosine phosphatase SHP-1 in macrophages, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 22719-22728.
61. Paling, N. R. D., Welham, M. J., Role of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 (src homology phosphatase-1) in the regulation of interleukin-3-induced survival, proliferation and signalling, (2002) *Biochem. J.* 368, 885-894.

62. Plutzky, J., Neel, B. G., Rosenberg, R. D., Isolation of a Src homology 2-containing tyrosine phosphatase, (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89, 1123-1127.
63. Banville, D., Stocco, R., Shen, S. H., Human protein tyrosine phosphatase 1C (PTPN6) gene structure: alternate promoter usage and exon skipping generate multiple transcripts, (1995) *Genomics* 27, 165-173.
64. Tomic, S., Greiser, U., Lammers, R., Kharitononkov, A., Imyaninov, E., Ullrich, A., Böhmer, F. D., Association of SH2 domain protein tyrosine phosphatases with the epidermal growth factor receptor in human tumor cells. Phosphatidic acid activates receptor dephosphorylation by PTP1C, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 21277-21284.
65. Tenev, T., Keilhack, H., Tomic, S., Stoyanov, B., Stein-Gerlach, M., Lammers, R., Krivtsov, A. V., Ullrich, A., Böhmer, F. D., Both SH2 domains are involved in interaction of SHP-1 with the epidermal growth factor receptor but cannot confer receptor-directed activity to SHP-1/SHP-2 chimera, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 5966-5973.
66. Keilhack, H., Müller, M., Böhmer, S.-A., Frank, C., Weidner, K. M., Birchmeier, W., Ligensa, T., Berndt, A., Kosmehl, H., Günther, B., Müller, T., Birchmeier, C., Böhmer, F. D., Negative regulation of Ros receptor tyrosine kinase signaling: An epithelial function of the SH2 domain protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2001) *J. Cell. Biol.* 152, 325-334.
67. Tidow, N., Kasper, B., Welte, K., SH2-containing protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are dramatically increased at the protein level in neutrophils from patients with severe congenital neutropenia (Kostmann's syndrome), (1999) *Exp. Hematol.* 27, 1038-1045.
68. Dong, F., Qiu, Y., Yi, T., Touw, I. P., Larner, A. C., The carboxyl terminus of the granulocyte colony-stimulating factor receptor, truncated in patients with severe congenital neutropenia/acute myeloid leukemia, is required for SH2-containing phosphatase-1 suppression of Stat activation, (2001) *J. Immunol.* 167, 6447-6452.
69. Herman, J. G., Baylin, S. B., Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation, (2003) *N. Engl. J. Med.* 349, 2042-2054.
70. Jones, P. A., Laird, P. W., Cancer epigenetics comes of age, (1999) *Nat. Genet.* 21, 163-167.
71. Oka, T., Ouchida, M., Koyama, M., Ogama, Y., Takada, S., Nakatani, Y., Tanaka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Kondo, E., Takahashi, K., Tsuchiyama, J., Tanimoto, M., Shimizu, K., Akagi, T., Gene silencing of the tyrosine phosphatase SHP-1 gene by aberrant methylation in leukemias/lymphomas, (2002) *Cancer Res.* 62, 6390-6394.
72. Oka, T., Yoshino, T., Hayashi, K., Ohara, N., Nakanishi, T., Yamaai, Y., Hiraki, A., Sogawa, C. A., Kondo, E., Teramoto, N., Takahashi, K., Tsuchiyama, J., Akagi, T., Reduction of hematopoietic cell-specific tyrosine phosphatase SHP-1 gene expression in natural killer cell lymphoma and various types of lymphomas/leukemias, (2001) *Am. J. Pathol.* 159, 1495-1505.
73. Johan, M. F., Bowen, D. T., Frew, M. E., Goodeve, A. C., Reilly, J. T., Aberrant methylation of the negative regulators RASSF1A, SHP-1 and SOCS-1 in myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia, (2005) *Br. J. Haematol.* 129, 60-65.
74. Zhang, Q., Raghunath, P. N., Vonderheid, E., Odum, N., Wasik, M. A., Lack of phosphotyrosine phosphatase SHP-1 expression in malignant T-cell lymphoma cells results from methylation of the SHP-1 promoter, (2000) *Am. J. Pathol.* 157, 1137-1146.
75. Zhang, Q., Wang, H. Y., Marzec, M., Raghunath, P. N., Nagasawa, T., Wasik, M. A., STAT3- and DNA methyltransferase 1-mediated epigenetic silencing of SHP-1 tyrosine phosphatase tumor suppressor gene in malignant T lymphocytes, (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102, 6948-6953.
76. Kossev, P. M., Raghunath, P. N., Bagg, A., Schuster, S., Tomaszewski, J. E., Wasik, M. A., SHP-1 expression by malignant small B-cell lymphomas reflects the maturation stage of their normal B-cell counterparts, (2001) *Am. J. Surg. Pathol.* 25, 949-955.

77. Khoury, J. D., Rassidakis, G. Z., Medeiros, L. J., Amin, H. M., Lai, R., Methylation of SHP-1 gene and loss of SHP-1 protein expression are frequent in systemic anaplastic large cell lymphomas, (2004) *Blood* 104, 1580-1581.
78. Chim, C. S., Fung, T. K., Cheung, W. C., Liang, R., Kwong, Y. L., SOCS1 and SHP1 hypermethylation in multiple myeloma: implications for epigenetic activation of the Jak/STAT pathway, (2004) *Blood* 103, 4630-4635.
79. Florian, S., Ghannadan, M., Mayerhofer, M., Aichberger, K. J., Hauswirth, A. W., Schernthaner, G.-H., Printz, D., Fritsch, G., Böhm, A., Sonneck, K., Krauth, M.-T., Müller, M. R., Sillaber, C., Sperr, W. R., Bühring, H.-J., Valent, P., Evaluation of normal and neoplastic human mast cells for expression of CD172a (SIRP α), CD47, and SHP-1, (2005) *J. Leukoc. Biol.* 77, 984-992.
80. Oomen, S. P. M. A., Ward, A. C., Hofland, L. J., Lamberts, S. W. J., Löwenberg, B., Touw, I. P., Somatostatin modulates G-CSF-induced but not interleukin-3-induced proliferative responses in myeloid 32D cells via activation of somatostatin receptor subtype 2, (2001) *Hematol. J.* 2, 322-329.
81. Zapata, P. D., Ropero, R. M., Valencia, A. M., Buscail, L., Lopez, J. I., Martin-Orozco, R. M., Prieto, J. C., Angula, J., Susini, C., Lopez-Ruiz, P., Colas, B., Autocrine regulation of human prostate carcinoma cell proliferation by somatostatin through the modulation of the SH2 domain containing protein tyrosine phosphatase (SHP)-1, (2002) *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87, 915-926.
82. Guillermet, J., Saint-Laurent, N., Rochaix, P., Cuvillier, O., Levade, T., Schally, A. V., Pradayrol, L., Buscail, L., Susini, C., Bousquet, C., Somatostatin receptor subtype 2 sensitizes human pancreatic cancer cells to death ligand-induced apoptosis, (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100, 155-160.
83. Ferjoux, G., Lopez, F., Esteve, J.-P., Ferrand, A., Vivier, E., Vely, F., Saint-Laurent, N., Pradayrol, L., Buscail, L., Susini, C., Critical role of Src and SHP-2 in sst2 somatostatin receptor-mediated activation of SHP-1 and inhibition of cell proliferation, (2003) *Mol. Biol. Cell* 14, 3911-3928.
84. Lahlou, H., Saint-Laurent, N., Esteve, J.-P., Eychene, A., Pradayrol, L., Pyronnet, S., Susini, C., Sst2 somatostatin receptor inhibits cell proliferation through Ras-, Rap1-, and B-Raf-dependent ERK2 activation, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 39356-39371.
85. Hortal, M., Ferjoux, G., Estival, A., Bertrand, C., Schulz, S., Pradayrol, L., Susini, C., Clemente, F., Inhibitory role of the somatostatin receptor sst2 on the intracrine-regulated cell proliferation induced by the 210-amino acid fibroblast growth factor-2 isoform, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 20574-20581.
86. Zatelli, M. C., Piccin, D., Tagliati, F., Bottoni, A., Luchin, A., degli Uberti, E. C., Src homology-2-containing protein tyrosine phosphatase-1 restrains cell proliferation in human medullary thyroid carcinoma, (2005) *Endocrinology* 146, 2692-2698.
87. Forget, G., Siminovitch, K. A., Brochu, S., Rivest, S., Radzioch, D., Olivier, M., Role of host phosphotyrosine phosphatase SHP-1 in the development of murine leishmaniasis, (2001) *Eur. J. Immunol.* 31, 3185-3196.
88. Nandan, D., Yi, T., Lopez, M., Lai, C., Reinert, N. E., *Leishmania* EF-1 α activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 50190-50197.
89. Nandan, D., Reiner, N. E., *Leishmania donovani* engages in regulatory interference by targeting macrophage protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *Clin. Immunol.* 114, 266-277.
90. Forget, G., Matte, C., Siminovitch, K. A., Rivest, S., Pouliot, P., Olivier, M., Regulation of the *Leishmania*-induced innate inflammatory response by the protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *Eur. J. Immunol.* 35, 1906-1917.

91. Pei, D., Neel, B. G., Walsh, C. T., Overexpression, purification, and characterization of SHPTP1, a Src homology 2-containing protein-tyrosine-phosphatase, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 1092-1096.
92. Pei, D., Lorenz, U., Klingmüller, U., Neel, B. G., Walsh, C. T., Intramolecular regulation of protein tyrosine phosphatase SH-PTP1: a new function for Src homology 2 domains, (1994) *Biochemistry* 33, 15483-15493.
93. Pei, D., Wang, J., Walsh, C. T., Differential functions of the two Src homology 2 domains in protein tyrosine phosphatase SH-PTP1, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 1141-1145.
94. Martin, A., Tsui, H. W., Shulman, M. J., Isenman, D., Tsui, F. W., Murine SHP-1 splice variants with altered Src homology 2 (SH2) domains. Implications for the SH2-mediated intramolecular regulation of SHP-1, (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 21725-21734.
95. Lurie, D. I., Scola, F., Fischer, E. H., Rubel, E. W., Tyrosine phosphatase SHP-1 immunoreactivity increases in a subset of astrocytes following deafferentation of the chicken auditory brainstem, (2000) *J. Comp. Neurol.* 421, 199-214.
96. Massa, P. T., Saha, S., Wu, C., Jarosinski, K. W., Expression and function of the protein tyrosine phosphatase SHP-1 in Oligodendrocytes, (2000) *GLIA* 29, 376-385.
97. Horvat, A., Schwaiger, F., Eager, G., Brocker, F., Streif, R., Knyazev, P., Ullrich, A., Kreutzberg, G. W., A novel role for protein tyrosine phosphatase SHP1 in controlling glial activation in normal and injured nervous system, (2001) *J. Neurosci.* 21, 865-874.
98. Tsui, H. W., Hasselblatt, K., Martin, A., Mok, S. C., Tsui, F. W., Molecular mechanisms underlying SHP-1 gene expression, (2002) *Eur. J. Biochem.* 269, 3057-3064.
99. Martin, A., Tsui, H. W., Tsui, F. W., SHP-1 variant proteins are absent in motheaten mice despite presence of splice variant transcripts with open reading frames, (1999) *Mol. Immunol.* 36, 1029-1041.
100. Niu, T., Liang, X., Yang, J., Zhao, Z., Zhou, G. W., Kinetic comparison of the catalytic domains of SHP-1 and SHP-2, (1999) *J. Cell. Biol.* 72, 145-150.
101. Hof, P., Pluskey, S., Dhe-Paganon, S., Eck, M. J., Shoelson, S. E., Crystal structure of the tyrosine phosphatase SHP-2, (1998) *Cell* 92, 440-450.
102. Yang, J., Liu, L., He, D., Song, X., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Crystal structure of human protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 6516-6520.
103. Yang, J., Chen, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4066-4071.
104. Yang, J., Liang, X., Niu, T., Meng, W., Zhao, Z., Zhou, G. W., Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 28199-28207.
105. Yang, J., Chen, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Protein tyrosine phosphatase SHP-1 specifically recognizes C-terminal residues of its substrates via helix alpha0, (2001) *J. Cell. Biochem.* 83, 14-20.
106. Yaffe, M., Phosphotyrosine-binding domains in signal transduction, (2002) *Mol. Cell. Biol.* 3, 177-186.
107. Wieligmann, K., Pineda De Castro, L. F., Zacharias, M., Molecular dynamics simulation on the free and complexed N-terminal SH2 domain of SHP-2, (2002) *In Silico Biol.* 2, 305-311.
108. Zhao, Z., Bouchard, P., Diltz, C. D., Shen, S. H., Fischer, E. H., Purification and characterization of a protein tyrosine phosphatase containing SH2 domains, (1993) *J. Biol. Chem.* 268, 2816-2820.

109. Lorenz, U., Ravichandran, K. S., Pei, D., Walsh, C. T., Burakoff, S. J., Neel, B. G., Lck-dependent tyrosyl phosphorylation of the phosphotyrosine phosphatase SH-PTP1 in murine T cells, (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 1824-1834.
110. Bouchard, P., Zhao, Z., Banville, D., Dumas, F., Fischer, E. H., Shen, S. H., Phosphorylation and identification of a major tyrosine phosphorylation site in protein tyrosine phosphatase 1C, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 19585-19589.
111. Uchida, T., Matozaki, T., Noguchi, T., Yamao, T., Horita, K., Suzuki, T., Fujioka, Y., Sakamoto, C., Kasuga, M., Insulin stimulates the phosphorylation of Tyr538 and the catalytic activity of PTP1C, a protein tyrosine phosphatase with Src homology-2 domains, (1994) *J. Biol. Chem.* 269, 12220-12228.
112. Kharbanda, S., Bharti, A., Pei, D., Wang, J., Pandey, P., Ren, R., Weichselbaum, R., Walsh, C. T., Kufe, D., The stress response to ionizing radiation involves c-Abl-dependent phosphorylation of SHPTP1, (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93, 6898-6901.
113. Yoshida, K., Kharbanda, S., Kufe, D., Functional interaction between SHPTP-1 and the Lyn tyrosine kinase in the apoptotic response to DNA damage, (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 34663-34668.
114. Poole, A. W., Jones, M. L., A SHPing tale: Perspectives on the regulation of SHP-1 and SHP-2 tyrosine phosphatases by the C-terminal tail, (2005) *Cell. Signal.* 17, 1323-1332.
115. Fawcett, V. C. J., Lorenz, U., Localization of Src homology 2 domain-containing phosphatase 1 (SHP-1) to lipid rafts in T-Lymphocytes: functional implications and a role for the SHP-1 carboxyl terminus, (2005) *J. Immunol.* 174, 2849-2859.
116. Tenev, T., Böhmer, S. A., Kaufmann, R., Frese, S., Bittorf, T., Beckers, T., Böhmer, F. D., Perinuclear localization of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 and inhibition of epidermal growth factor-stimulated STAT1/3 activation in A431 cells, (2000) *Eur. J. Cell. Biol.* 79, 261-271.
117. Ram, P. A., Waxman, D. J., Interaction of growth hormone-activated STATs with SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1 and nuclear JAK2 tyrosine kinase, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 17694-17702.
118. Yang, W., Tabrizi, M., Yi, T., A bipartite NLS at the SHP-1 C-terminus mediates cytokine-induced SHP-1 nuclear localization in cell growth control, (2002) *Blood Cells Mol. Dis.* 28, 63-74.
119. Craggs, G., Kellie, S., A functional nuclear localization sequence in the C-terminal domain of SHP-1, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 23719-23725.
120. Frank, C., Keilhack, H., Opitz, F., Zschörnig, O., Böhmer, F. D., Binding of phosphatidic acid to the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 as a basis for activity modulation, (1999) *Biochemistry* 38, 11993-12002.
121. Cunnick, J. M., Dorsey, J. F., Mei, L., Wu, J., Reversible regulation of SHP-1 tyrosine phosphatase activity by oxidation, (1998) *Biochem. Mol. Biol. Int.* 45, 887-894.
122. Meng, T.-C., Fukada, T., Tonks, N. K., Reversible oxidation and inactivation of protein tyrosine phosphatases in vivo, (2002) *Mol. Cell* 9, 387-399.
123. Barrett, D. M., Black, S. M., Todor, H., Schmidt-Ullrich, R. K., Dawson, K. S., Mikkelsen, R. B., Inhibition of protein-tyrosine phosphatases by mild oxidative stresses is dependent on S-nitrosylation, (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 14453-14461.
124. Östman, A., Hellberg, C., Böhmer, F. D., Protein-tyrosine phosphatases and cancer, (2006) *Nature Rev.* 6, 307-320.

125. Freeman, B. A., Crapo, J. D., Biology of disease: free radicals and tissue injury, (1982) *Lab. Invest.* 47, 412-426.
126. Dröge, W., Free radicals in the physiological control of cell function, (2002) *Physiol. Rev.* 82, 47-95.
127. Zhang, Z.-Y., Mechanistic studies on protein tyrosine phosphatases, (2003) *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 73, 171-220.
128. Denu, J. M., Dixon, J. E., Protein tyrosine phosphatases: mechanisms of catalysis and regulation, (1998) *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2, 633-641.
129. Yang, J., Liang, X., Niu, T., Meng, W., Zhao, Z., Zhou, G. W., Crystal structure of the catalytic domain of protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 28199-28207.
130. Yang, J., Chen, Z., Niu, T., Liang, X., Zhao, Z. J., Zhou, G. W., Structural basis for substrate specificity of protein-tyrosine phosphatase SHP-1, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4066-4071.
131. Zhang, Z., Thieme-Sefler, A. M., Maclean, D., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., Sawyer, T. K., Dixon, J. E., Substrate specificity of the protein tyrosine phosphatases, (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 4446-4450.
132. Wang, P., Fu, H., Snavley, D. F., Freitas, M. A., Pei, D., Screening combinatorial libraries by mass spectrometry. 2. Identification of optimal substrates of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2002) *Biochemistry* 41, 6202-6210.
133. Kumar, S., Avraham, S., Bharti, A., Goyal, J., Pandey, P., Kharbanda, S., Negative regulation of Pyk2/Related adhesion focal tyrosine kinase signal transduction by hematopoietic tyrosine phosphatase SHPTP1, (1999) *J. Biol. Chem.* 274, 30657-30663.
134. Binstadt, B. A., Billadeau, D. D., Jevremovic, D., Williams, B. L., Fang, N., Yi, T., Koretzky, G. A., Abraham, R. T., Leibson, P. J., SLP-76 is a direct substrate of SHP-1 recruited to killer cell inhibitory receptors, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 27518-27523.
135. Somani, A.-K., Bignon, J. S., Mills, G. B., Siminovitch, K. A., Branch, D. R., Src kinase activity is regulated by the SHP-1 protein tyrosine phosphatase, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 21113-21119.
136. Chiang, G. G., Sefton, B. M., Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein-tyrosine phosphatase, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 23173-23178.
137. Marsh, H. N., Dubreuil, C. I., Quevedo, C., Lee, A., Majdan, M., Walsh, G. S., Hausdorff, S., Said, F. A., Zoueva, O., Kozłowski, M., Siminovitch, K., Neel, B. G., Miller, F. D., Kaplan, D. R., SHP-1 negatively regulates neuronal survival by functioning as a TrkA phosphatase, (2003) *J. Cell. Biol.* 163, 999-1010.
138. a) Songyang, Z., Shoelson, S. E., McGlade, J., Olivier, P., Pawson, T., Bustelo, X. R., Barbacid, M., Sabe, H., Hanafusa, H., Yi, T., Ren, R., Baltimore, D., Ratnoffsky, S., Feldman, R. A., Cantley, L. C., Specific motifs recognized by the SH2 domains of Csk, 3BP2, fps/fes, Grb2, HCP, SHC, Syk, and Vav, (1994) *Mol. Cell. Biol.* 14, 2777-2785. b) Cantley, L. C., Songyang, Z., Specificity in recognition of phosphopeptides by src-homology 2 domains, (1994) *J. Cell Sci. Suppl.* 18, 121-126.
139. Doody, G. M., Justement, L. B., Delibrias, C. C., Matthews, R. J., Lin, J., Thomas, M. L., Frearon, D. T., A role in B cell activation for CD22 and the protein tyrosine phosphatase SHP-1, (1995) *Science* 269, 242-244.
140. Klingmüller, U., Lorenz, U., Cantley, L. C., Neel, B. G., Lodish, H. F., Specific recruitment of SH-PTP1 to the erythropoietin receptor causes inactivation of Jak2 and termination of proliferative signals, (1995) *Cell* 80, 729-738.

141. D'Ambrosio, D., Hippen, K. L., Minskoff, S. A., Mellman, I., Pani, G., Siminovitch, K. A., Cambier, J. C., Recruitment and activation of PTP1C in negative regulation of antigen receptor signaling by Fc γ RIIB1, (1995) *Science* 268, 293-297.
142. Huyer, G., Li, Z. M., Adam, M., Huckle, W. R., Ramachandran, C., Direct determination of the sequence recognition requirements of the SH2 domains of SH-PTP2, (1995) *Biochemistry* 34, 1040-1049.
143. Beebe, K. D., Wang, P., Arabaci, G., Pei, D., Determination of the binding specificity of the SH2 domains of protein tyrosine phosphatase SHP-1 through the screening of a combinatorial phosphotyrosyl peptide library, (2000) *Biochemistry* 39, 13251-13260.
144. Sweeney, M. C., Wavreille, A.-S., Park, Y., Butchar, J. P., Tridandapani, S., Pei, D., Decoding protein-protein interactions through combinatorial chemistry: sequence specificity of SHP-1, SHP-2, and SHIP SH2 domains, (2005) *Biochemistry* 44, 14932-14947.
145. Law, C. L., Sidorenko, S. P., Chandran, K. A., Zhao, Z., Shen, S. H., Fischer, E. H., Clark, E. A., CD22 associates with protein tyrosine phosphatase 1C, Syk, and phospholipase C- γ 1 upon B cell activation, (1996) *J. Exp. Med.* 183, 547-560.
146. Bone, H., Dechert, U., Jirik, F., Schrader, J. W., Welham, M. J., SHP1 and SHP2 protein tyrosine phosphatases associate with bc after interleukin-3-induced receptor tyrosine phosphorylation, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 14470-14476.
147. Lopez, F., Esteve, J. P., Buscail, L., Delesque, N., Saint-Laurent, N., Theveniau, M., Nahmias, C., Vaysse, N., Susini, C., The tyrosine phosphatase SHP-1 associates with the sst2 somatostatin receptor and is an essential component of sst2-mediated inhibitory growth signaling, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 24448-24454.
148. Keilhack, H., Tenev, T., Nyakatura, E., Godovac-Zimmermann, J., Nielsen, L., Seedorf, K., Böhmer, F. D., Phosphotyrosine 1173 mediates binding of the protein-tyrosine phosphatase SHP-1 to the epidermal growth factor receptor and attenuation of receptor signaling, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 24839-24846.
149. Cella, M., Dohring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., Colonna, M., A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing, (1997) *J. Exp. Med.* 185, 1743-1751.
150. Beauchemin, N., Kunath, T., Robitaille, J., Chow, B., Turbide, C., Daniels, E., Veillette, A., Association of biliary glycoprotein with protein tyrosine phosphatase SHP-1 in malignant colon epithelial cells, (1997) *Oncogene* 14, 783-790.
151. Samaridis, J., Colonna, M., Cloning of novel immunoglobulin superfamily receptors expressed on human myeloid and lymphoid cells: structural evidence for new stimulatory and inhibitory pathways, (1997) *Eur. J. Immunol.* 27, 660-665.
152. Zhang, Y., Allison, J. P., Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein, (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94, 9273-9278.
153. Burshtyn, D. N., Yang, W., Yi, T., Long, E. O., A novel phosphotyrosine motif with a critical amino acid at position -2 for the SH2 domain-mediated activation of the tyrosine phosphatase SHP-1, (1997) *J. Biol. Chem.* 272, 13066-13072.
154. Haque, S. J., Harbor, P., Tabrizi, M., Yi, T., Williams, B. R., Protein-tyrosine phosphatase SHP-1 is a negative regulator of IL-4 and IL-3-dependent signal transduction, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 33893-33896.
155. Kozlowski, M., Larose, L., Lee, F., Le, D. M., Rottapel, R., Siminovitch, K. A., SHP-1 binds and negatively modulates the c-Kit receptor by interaction with tyrosine 569 in the c-kit juxtamembrane domain, (1998) *Mol. Cell. Biol.* 18, 2089-2099.

156. Carretero, M., Palmieri, G., Llano, M., Tullio, V., Santoni, A., Geraghty, D. E., Lopez-Botet, M., Specific engagement of the CD94/NKG2-A killer inhibitory receptor by the HLA-E class Ib molecule induces SHP-1 phosphatase recruitment to tyrosine-phosphorylated NKG2-A: evidence for receptor function in heterologous transfectants, (1998) *Eur. J. Immunol.* **28**, 1280-1291.
157. Adachi, T., Flaswinkel, H., Yakura, H., Reth, M., Tsubata, T., Cutting edge: The B cell surface protein CD72 recruits the tyrosine phosphatase SHP-1 upon tyrosine phosphorylation, (1998) *J. Immunol.* **160**, 4662-4665.
158. Perez-Villar, J. J., Whitney, G. S., Bowen, M. A., Hewgill, D. H., Aruffo, A. A., Kanner, S. B., CD5 negatively regulates the T-cell antigen receptor signal transduction pathway: involvement of SH2-containing phosphotyrosine phosphatase SHP-1, (1999) *Mol. Cell. Biol.* **19**, 2903-2912.
159. Pumphrey, N. J., Taylor, V., Freeman, S., Douglas, M. R., Bradfield, P. F., Young, S. P., Lord, J. M., Wakelam, M. J., Bird, I. N., Salmon, M., Buckley, C. D., Differential association of cytoplasmic signalling molecules SHP-1, SHP-2, SHIP and phospholipase C- γ 1 with PECAM-1/CD31, (1999) *FEBS Lett.* **450**, 77-83.
160. Huber, M., Izzi, L., Grondin, P., Houde, C., Kunath, T., Veillette, A., Beauchemin, N., The carboxy-terminal region of biliary glycoprotein controls its tyrosine phosphorylation and association with protein-tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 in epithelial cells, (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 335-344.
161. Taylor, V. C., Buckley, C. D., Douglas, M., Cody, A. J., Simmons, D. L., Freeman, S. D., The myeloid-specific sialic acid-binding receptor, CD33, associates with the protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 11505-11512.
162. Bruhns, P., Marchetti, P., Fridman, W. H., Vivier, E., Daeron, M., Differential roles of N- and C-terminal immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs during inhibition of cell activation by killer cell inhibitory receptors, (1999) *J. Immunol.* **162**, 3168-3175.
163. Famiglietti, S. J., Nakamura, K., Cambier, J. C., Unique features of SHIP, SHP-1 and SHP-2 binding to Fc γ RIIb revealed by surface plasmon resonance analysis, (1999) *Immunol. Lett.* **68**, 35-40.
164. Greer, S. F., Justement, L. B., CD45 regulates tyrosine phosphorylation of CD22 and its association with the protein tyrosine phosphatase SHP-1, (1999) *J. Immunol.* **162**, 5278-5286.
165. Vila-Coro, A. J., Rodriguez-Frade, J. M., Martin De Ana, A., Moreno-Ortiz, M. C., Martinez, A. C., Mellado, M., The chemokine SDF-1 α triggers CXCR4 receptor dimerization and activates the JAK/STAT pathway, (1999) *FASEB J.* **13**, 1699-1710.
166. Cosman, D., Fanger, N., Borges, L., Human cytomegalovirus, MHC class I and inhibitory signalling receptors: more questions than answers, (1999) *Immunol. Rev.* **168**, 177-185.
167. Blasioli, J., Paust, S., Thomas, M. L., Definition of the sites of interaction between the protein tyrosine phosphatase SHP-1 and CD22, (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 2303-2307.
168. Nakamura, K., Brauweiler, A., Cambier, J. C., Effects of Src homology domain 2 (SH2)-containing inositol phosphatase (SHIP), SH2-containing phosphotyrosine phosphatase (SHP-1) and SHP-2 SH2 decoy proteins on Fc γ RIIB1-effector interactions and inhibitory functions, (2000) *J. Immunol.* **164**, 631-638.
169. Xu, M., Zhao, R., Zhao, Z. J., Identification and characterization of leukocyte-associated Ig-like receptor-1 as a major anchor protein of tyrosine phosphatase SHP-1 in hematopoietic cells, (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 17440-17446.
170. Mousseau, D. D., Banville, D., L'Abbe, D., Bouchard, P., Shen, S. H., PILR α , a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing protein, recruits SHP-1 upon tyrosine phosphorylation and is paired with the truncated counterpart PILR β , (2000) *J. Biol. Chem.* **275**, 4467-4474.

171. Paul, S. P., Taylor, L. S., Stansbury, E. K., McVicar, D. W., Myeloid specific human CD33 is an inhibitory receptor with differential ITIM function in recruiting the phosphatases SHP-1 and SHP-2, (2000) *Blood* 96, 483-490.
172. Keilhack, H., Hellman, U., van Hengel, J., van Roy, F., Godovac-Zimmermann, J., Böhmer, F. D., The protein-tyrosine phosphatase SHP-1 binds to and dephosphorylates p120 catenin, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 26376-26384.
173. Bruhns, P., Vely, F., Malbec, O., Fridman, W. H., Vivier, E., Daeron, M., Molecular basis of the recruitment of the SH2 domain-containing inositol 5-phosphatases SHIP1 and SHIP2 by Fc γ RIIB, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 37357-37364.
174. Philosof-Oppenheim, R., Hampe, C. S., Schlessinger, K., Fridkin, M., Pecht, I., An immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif, with serine at site Y-2, binds SH2-domain-containing phosphatases, (2000) *Eur. J. Biochem.* 267, 703-711.
175. de Vet, E. C., Aguado, B., Campbell, R. D., G6b, a novel immunoglobulin superfamily member encoded in the human major histocompatibility complex, interacts with SHP-1 and SHP-2, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 42070-42076.
176. Kashiwada, M., Giallourakis, C. C., Pan, P. Y., Rothman, P. B., Immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif of the IL-4 receptor associates with SH2-containing phosphatases and regulates IL-4- induced proliferation, (2001) *J. Immunol.* 167, 6382-6387.
177. Henshall, T. L., Jones, K. L., Wilkinson, R., Jackson, D. E., Src homology 2 domain-containing protein-tyrosine phosphatases, SHP-1 and SHP-2, are required for platelet endothelial cell adhesion molecule-1/CD31-mediated inhibitory signaling, (2001) *J. Immunol.* 166, 3098-3106.
178. Adachi, T., Wienands, J., Wakabayashi, C., Yakura, H., Reth, M., Tsubata, T., SHP-1 requires inhibitory co-receptors to down-modulate B cell antigen receptor-mediated phosphorylation of cellular substrates, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 26648-26655.
179. Lesourne, R., Bruhns, P., Fridman, W. H., Daeron, M., Insufficient phosphorylation prevents Fc γ RIIB from recruiting the SH2 domain-containing protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 6327-6336.
180. Sathish, J. G., Johnson, K. G., Fuller, K. J., LeRoy, F. G., Meyaard, L., Sims, M. J., Matthews, R. J., Constitutive association of SHP-1 with leukocyte-associated Ig-like receptor-1 in human T-cells, (2001) *J. Immunol.* 166, 1763-1770.
181. Huang, X., Yuan, Z., Chen, G., Zhang, M., Zhang, W., Yu, Y., Cao, X., Cloning and characterization of a novel ITIM containing lectin-like immunoreceptor LLIR and its two transmembrane region deletion variants, (2001) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 281, 131-140.
182. Whitney, G., Wang, S., Chang, H., Cheng, K.-Y., Lu, P., Zhou, X. D., Yang, W.-P., McKinnon, M., Longhre, M., A new siglec family member, siglec-10, is expressed in cells of the immune system and has signalling properties similar to CD33, (2001) *Eur. J. Biochem.* 268, 6083-6096.
183. Yu, Z., Lai, C.-M., Maoui, M., Banville, D., Shen, S.-H., Identification and characterization of S2V, a novel putative siglec that contains two V set Ig-like domains and recruits protein-tyrosine phosphatases SHPs, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 23816-23824.
184. Daigle, I., Yousefi, S., Colonna, M., Green, D. R., Simon, H.-U., Death receptors bind SHP-1 and block cytokine-induced anti-apoptotic signaling in neutrophils, (2002) *Nat. Med.* 8, 61-67.
185. Yu, W.-M., Hawley, T., Hawley, R. G., Qu, C.-K., Role of the docking protein Gab2 in b $_1$ -integrin signaling pathway-mediated hematopoietic cell adhesion and migration, (2002) *Blood* 99, 2351-2359.

186. Xu, F., Xu, M.-J., Zhao, R., Guerrah, A., Zeng, F., Zhao, Z. J., Tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 are associated with distinct tyrosine-phosphorylated proteins, (2002) *Exp. Cell Res.* 272, 75-83.
187. Angata, T., Kerr, S. C., Greaves, D. R., Varki, N. M., Crocker, P. R., Varki, A., Cloning and characterization of human siglec-11, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 24466-24474.
188. Kitzig, F., Martinez-Barriocanal, A., Lopez-Botet, M., Sayos, J., Cloning of two new splice variants of Siglec-10 and mapping of the interaction between Siglec-10 and SHP-1, (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 296, 355-362.
189. Watanabe, N., Gavrieli, M., Sedy, J. R., Yang, J., Fallarino, F., Loftin, S. K., Hurchla, M. A., Zimmerman, N., Sim, J., Zang, X., Murphy, T. L., Russell, J. H., Allison, J. P., Murphy, K. M., BTLA is a lymphocyte inhibitory receptor with similarities to CTLA-4 and PD-1, (2003) *Nat. Immunol.* 4, 670-679.
190. Falco, M., Biassoni, R., Bottino, C., Vitale, M., Sivori, S., Augugliaro, R., Moretta, L., Moretta, A., Identification and molecular cloning of p75/AIRM1, a novel member of the sialoadhesin family that functions as an inhibitory receptor in human natural killer cells, (1999) *J. Exp. Med.* 190, 793-802.
191. Avril, T., Floyd, H., Lopez, F., Vivier, E., Crocker, P. R., The membrane-proximal immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif is critical for the inhibitory signaling mediated by Siglecs-7 and -9, CD33-related Siglecs expressed on human monocytes and NK cells, (2004) *J. Immunol.* 173, 6841-6849.
192. Ikehara, Y., Ikehara, S. K., Paulson, J. C., Negative regulation of T cell receptor signaling by Siglec-7 (p70/AIRM) and Siglec-9, (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 43117-43125.
193. Sui, L., Li, N., Liu, Q., Zhang, W., Wan, T., Wang, B., Luo, K., Sun, H., Cao, X., IgSF13, a novel human inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is preferentially expressed in dendritic cells and monocytes, (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 319, 920-928.
194. Alvarez-Errico, D., Aguilar, H., Kitzig, F., Brckalo, T., Sayos, J., Lopez-Botet, M., IREM-1 is a novel inhibitory receptor expressed by myeloid cells, (2004) *Eur. J. Immunol.* 34, 3690-3701.
195. Tauchi, T., Damen, J. E., Toyama, K., Feng, G. S., Broxmeyer, H. E., Krystal, G., Tyrosine 425 within the activated erythropoietin receptor binds Syp, reduces the erythropoietin required for Syp tyrosine phosphorylation, and promotes mitogenesis, (1996) *Blood* 87, 4495-4501.
196. Mason, J. M., Beattie, B. K., Liu, Q., Dumont, D. J., Barber, D. L., The SH2 inositol 5-phosphatase SHIP1 is recruited in an SH2-dependent manner to the erythropoietin receptor, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 4398-4406.
197. Olcese, L., Lang, P., Vely, F., Cambiaggi, A., Marguet, D., Blery, M., Hippen, K. L., Biassoni, R., Moretta, A., Moretta, L., Cambier, J. C., Vivier, E., Human and mouse killer-cell inhibitory receptors recruit PTP1C and PTP1D protein tyrosine phosphatases, (1996) *J. Immunol.* 156, 4531-4534.
198. Fry, A. M., Lanier, L. L., Weiss, A., Phosphotyrosines in the killer cell inhibitory receptor motif of NKB1 are required for negative signaling and for association with protein tyrosine phosphatase 1C, (1996) *J. Exp. Med.* 184, 295-300.
199. Bottino, C., Falco, M., Parolini, S., Marcenaro, E., Augugliaro, R., Sivori, S., Landi, E., Biassoni, R., Notarangelo, L. D., Moretta, L., Moretta, A., NTB-A [correction of GNTB-A], a novel SH2D1A-associated surface molecule contributing to the inability of natural killer cells to kill Epstein-Barr virus-infected B cells in X-linked lymphoproliferative disease, (2001) *J. Exp. Med.* 194, 235-246.

200. Avril, T., Freeman, S. D., Attrill, H., Clarke, R. G., Crocker, P. R., Siglec-5 (CD170) can mediate inhibitory signaling in the absence of immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif phosphorylation, (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 19843-19851.
201. Chughtai, N., Schimchowitsch, S., Lebrun, J.-J., Ali, S., Prolactin induces SHP-2 association with Stat5, nuclear translocation, and binding to the beta-casein gene promoter in mammary cells, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 31107-31114.
202. Gavrieli, M., Watanabe, N., Loftin, S. K., Murphy, T. L., Murphy, K. M., Characterization of phosphotyrosine binding motifs in the cytoplasmic domain of B and T lymphocyte attenuator required for association with protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2, (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 312, 1236-1243.
203. Fournier, N., Chalus, L., Durand, I., Garcia, E., Pin, J.-J., Churakova, T., Patel, S., Zlot, C., Gorman, D., Zurawski, S., Abrams, J., Bates, E. E. M., Garrone, P., FDF30, a novel inhibitory receptor of the immunoglobulin superfamily, is expressed by human dendritic and myeloid cells, (2000) *J. Immunol.* 165, 1197-1209.
204. Chemnitz, J. M., Parry, R. V., Nichols, K. E., June, C. H., Riley, J. L., SHP-1 and SHP-2 associate with immunoreceptor tyrosine-based switch motif of programmed death 1 upon primary human T cell stimulation, but only receptor ligation prevents T cell activation, (2004) *J. Immunol.* 173, 945-954.
205. Sheppard, K.-A., Fitz, L. J., Lee, J. M., Benander, C., George, J. A., Wooters, J., Qiu, Y., Jussif, J. M., Carter, L. L., Wood, C. R., Chaudhary, D., PD-1 inhibits T-cell receptor induced phosphorylation of the ZAP70/CD3 ζ signalosome and downstream signaling to PKC θ , (2004) *FEBS Lett.* 574, 37-41.
206. Cherkasov, A., Nandan, D., Reiner, N. E., Selective targeting of indel-inferred differences in spatial structures of highly homologous proteins, (2005) *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics* 58, 950-954.
207. Roccato, E., Miranda, C., Raho, G., Pagliardini, S., Pierotti, M. A., Greco, A., Analysis of SHP-1-mediated down-regulation of the TRK-T3 oncoprotein identifies Trk-fused gene (TFG) as a novel SHP-1-interacting protein, (2005) *J. Biol. Chem.* 280, 3382-3389.
208. Avril, T., Attrill, H., Zhang, J., Raper, A., Crocker, P. R., Negative regulation of leucocyte functions by CD33-related siglecs, (2006) *Biochem. Soc. Trans.* 34, 1024-1027.
209. Senis, Y. A., Tomlinson, M. G., Garcia, A., Dumon, S., Heath, V. L., Herbert, J., Cobbold, S. P., Spalton, J. C., Ayman, S., Antrobus, R., Zitzmann, N., Bicknell, R., Frampton, J., Authi, K. S., Martin, A., Wakelam, M. J. O., Watson, S. P., A comprehensive proteomics and genomics analysis reveals novel transmembrane proteins in human platelets and mouse megakaryocytes including G6b-B, a novel immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif protein, (2007) *Mol. Cell. Proteomics* 6, 548-564.
210. Ottinger, E. A., Botfield, M. C., Shoelson, S. E., Tandem SH2 domains confer high specificity in tyrosine kinase signaling, (1998) *J. Biol. Chem.* 273, 729-735.
211. O'Brien, R., Rugman, P., Renzoni, D., Layton, M., Handa, R., Hilyard, K., Waterfield, M. D., Driscoll, P. C., Ladbury, J. E., Alternative modes of binding of proteins with tandem SH2 domains, (2000) *Protein Science* 9, 570-579.
212. Bialy, L., Waldmann, H., Inhibitors of protein tyrosine phosphatases: Next-generation drugs?, (2005) *Angew. Chem. Int. Ed.* 44, 2-27.
213. Dewang, P. M., Hsu, N.-M., Peng, S.-Z., Li, W.-R., Protein tyrosine phosphatases and their inhibitors, (2005) *Curr. Med. Chem.* 12, 1-22.
214. Ueda, K., Usui, T., Nakayama, H., Ueki, M., Takio, K., Ubukata, M., Osada, H., 4-isoavenaciolide covalently binds and inhibits VHR, a dual-specificity phosphatase, (2002) *FEBS Lett.* 525, 48-52.

215. Umezawa, K., Kawakami, M., Watanabe, T., Molecular design and biological activities of protein-tyrosine phosphatase inhibitors, (2003) *Pharmacol. Ther.* 99, 15-24.
216. Park, D., Shim, Y. S., Kim, K. C., Park, J., Yang, D., Cho, H., Inactivation of protein tyrosine phosphatases by aryloxiranes, (2002) *J. Kor. Chem. Soc.* 46, 296-300.
217. Arabaci, G., Yi, T., Fu, H., Porter, M. E., Beebe, K. D., Pei, D., α -Bromoacetophenone derivatives as neutral protein tyrosine phosphatase inhibitors: Structure-activity relationship, (2002) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 12, 3047-3050.
218. Park, J., Pei, D., Peptidyl aldehydes as reversible covalent inhibitors of SRC homology 2 domains, (2003) *Biochemistry* 42, 5159-5167.
219. Park, J., Pei, D., *trans*- β -Nitrostyrene derivatives as slow-binding inhibitors of protein tyrosine phosphatases, (2004) *Biochemistry* 43, 15014-15021.
220. Levitzki, A., Signal-transduction therapy. A novel approach to disease management, (1994) *Biochemistry* 226, 1-13.
221. Burke, T. R. Jr., Nomizu, M., Otaka, A., Smyth, M. S., Roller, P. P., Case, R. D., Wolf, G., Shoelson, S. E., Cyclic peptide inhibitors of phosphatidylinositol 3-kinase p85 SH2 domain binding, (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 201, 1148-1153.
222. Lung, F.-D. T., Chang, C.-W., Chong, M.-C., Liou, C.-C., Li, P., Peach, M. L., Nicklaus, M. C., Lou, B.-S., Roller, P.P., Small nonphosphorylated Grb2-SH2 domain antagonists evaluated by surface plasmon resonance technology, (2005) *Biopolymers* 80, 628-635.
223. Burke, T. R. Jr., Development of Grb2 SH2 domain signaling antagonists: A potential new class of antiproliferative agents, (2006) *Int. J. Peptide Res. Therap.* 12, 33-48.
224. Smithgall, T. E., SH2 and SH3 domains: Potential targets for anti-cancer drug design. (1995) *J. Pharmacol. Toxicol. Meth.* 34, 125-132.
225. Zhao, R., Fu, X., Teng, L., Li, Q., Zhao, Z. J., Blocking the function of tyrosine phosphatase SHP-2 by targeting its SH2 domains, (2003) *J. Biol. Chem.* 278, 42893-42898.
226. O'Brien, R., Rugman, P., Renzoni, D., Layton, M., Handa, R., Hilyard, K., Waterfield, M. D., Driscoll, P. C., Ladbury, J. E., Alternative modes of binding of proteins with tandem SH2 domains, (2000) *Protein Sci.* 9, 570-579.
227. Vu, C.B., Recent advances in the design and synthesis of SH2 inhibitors of Src, Grb2 and ZAP-70, (2000) *Curr. Med. Chem.* 7, 1081-1100.
228. Chiang, G. G., Sefton, B., M., Specific dephosphorylation of the Lck tyrosine protein kinase at Tyr-394 by the SHP-1 protein tyrosine phosphatase, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 23173-23178.
229. Somani, A.-K., Yuen, K., Xu, F., Zhang, J., Branch, D. R., Siminovitch, K. A., The SH2 domain containing tyrosine phosphatase-1 down-regulates activation of Lyn and Lyn-induced tyrosine phosphorylation of the CD19 receptor in B cells, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 1938-1944.
230. Cuevas, B. D., Lu, Y., Mao, M., Zhang, J., LaPushin, R., Siminovitch, K., Mills, G. B., Tyrosine phosphorylation of p85 relieves its inhibitory activity on phosphatidylinositol 3-kinase, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 27455-27461.
231. Arnold, S. F., Obourn, J. D., Jaffe, H., Notides, A. C., Phosphorylation of the human estrogen receptor on tyrosine 537 *in vivo* and by Src family tyrosine kinases *in vitro*, (1995) *Mol. Endocrinology* 9, 24-33.
232. Kimura, T. Zhang, J., Sagawa, K., Sakaguchi, K., Appella, E., Siraganian, R. P., Syk-independent tyrosine phosphorylation and association of the protein tyrosine phosphatases SHP-1 and SHP-2 with the high affinity IgE receptor, (1997) *J. Immunol.* 159, 4426-4434.
233. Eklund, E. A., Goldenberg, I., Lu, Y., Abdrejcic, J., Kakar R., SHP-1 protein-tyrosine phosphatase regulates HoxA10 DNA binding and transcriptional repression activity in undifferentiated myeloid cells, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 36878-36888.

234. Stebbins, C. C., Watzl, C., Billadeau, D. D., Leibson, P. J., Burshtyn, D. N., Long, E. O., Vav1 dephosphorylation by the tyrosine phosphatase SHP-1 as a mechanism for inhibition of cellular cytotoxicity, (2003) *Mol. Cell. Biol.* 23, 6291-6299.
235. Zhou, B., Wang, Z. X., Zhao, Y., Brautigan, D. L., Zhang, Z. Y., The specificity of extracellular signal-regulated kinase 2 dephosphorylation by protein phosphatases, (2002) *J. Biol. Chem.* 277, 31818-31825.
236. Klinghoffer, R. A., Kazlauskas, A., Identification of a putative Syp substrate, the PDGF beta receptor, (1995) *J. Biol. Chem.* 270, 22208-22217.
237. Zhang, Z. Y., Walsh, A. B., Wu, L., McNamara, D. J., Dobrusin, E. M., Miller, W. T., Determinants of Substrate Recognition in the Protein-tyrosine Phosphatase, PTP1, (1996) *J. Biol. Chem.* 271, 5386-5392.
238. Myers, M. P., Andersen, J. N., Cheng, A., Tremblay, M. L., Horvath, C. M., Parisien, J. P., Salmeen, A., Barford, D., Tonks, N. K., TYK2 and JAK2 are substrates of protein-tyrosine phosphatase 1B, (2001) *J. Biol. Chem.* 276, 47771-47774.
239. Aoki, N., Matsuda, T., A cytosolic protein-tyrosine phosphatase PTP-1B specifically dephosphorylates and deactivates prolactin-activated STAT5a and STAT5b, (2000) *J. Biol. Chem.* 275, 39718-39726.
240. Salmeen, A., Andersen, J. N., Myers, M. P., Tonks, N. K., Barford, D., Molecular basis for the dephosphorylation of the activation segment of the insulin receptor by protein tyrosine phosphatase 1B, (2000) *Mol. Cell* 6, 1401-1412.
241. Espanel, X., Huguenin-Reggiani, M., Van Huijsduijnen, R. H., The SPOT technique as a tool for studying protein tyrosine phosphatase substrate specificities, (2002) *Protein Science* 11, 2326-2334.

ANHANG A: PUBLIKATIONEN

Verzeichnis der dieser Habilitationsschrift beigegeführten Publikationen (7 Originalarbeiten, 1 Review, 1 Proceedingsbeitrag, korrespondierender Autor):

- [1] Reissmann, S., Imhof, D., Development of conformationally restricted analogues of bradykinin and somatostatin using constrained amino acids and different types of cyclization, (2004) *Curr. Med. Chem.* 11, 2823-2844.
- [2] Imhof, D., Nothmann, D., Zoda, M. S., Hampel, K., Wegner, J., Böhmer, F. D., and Reissmann, S., Synthesis of linear and cyclic phosphopeptides as ligands for the N-terminal SH2 domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *J. Pept. Sci.* 11, 390-400.
- [3] Imhof, D., Wieligmann, K., Hampel, K., Nothmann, D., Zoda, M. S., Schmidt-Arras, D., Zacharias, M., Reissmann, S., Böhmer, F. D., Design and biological evaluation of linear and cyclic phosphopeptide ligands of the N-terminal SH2 domain of protein tyrosine phosphatase SHP-1, (2005) *J. Med. Chem.* 48, 1528-1539.
- [4] Hampel, K., Kaufhold, I., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Imhof, D., Phosphopeptide ligands of the SHP-1 N-SH2 domain: Effects on binding and stimulation of phosphatase activity, (2006) *ChemMedChem* 1, 869-877.
- [5] Imhof, D., Wavreille, A.-S., May, A., Zacharias, M., Tridandapani, S., Pei, D., Sequence specificity of SHP-1 and SHP-2 SH2 domains: Critical roles of residues beyond the pY+3 position, (2006) *J. Biol. Chem.* 281, 20271-20282.
- [6] Frank, C., Burkhardt, C., Imhof, D., Ringel, J., Zschörnig, O., Wieligmann, K., Zacharias, M., Böhmer, F. D., Effective dephosphorylation of Src substrates by SHP-1, (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 11375-11383.
- [7] Teichmann, K., Winkler, R., Hampel, K., Trümpler, A., Böhmer, F. D., Imhof, D., Dephosphorylation of a multisite phosphorylated segment from receptor tyrosine kinase Ros by SHP-1 and PTP1B, (2007) *J. Chromatography B Analyt. Technol. Biomed. Life Sci.* 853, 204-213.
- [8] Musharraf, A., Marksches, N., Englert, C., and Imhof, D., Eyes absent proteins: characterization of substrate specificity and phosphatase activity of mutants associated with branchial, otic and renal anomalies, *ChemBioChem*, in revision.
- [9] Imhof, D., Niksch, T., Zoda, M. S., Teichmann, K., Fabisch, C., Erdsack, J., Reissmann, S., Synthetic strategies to backbone-side chain cyclic peptides containing N^α-functionalized phosphotyrosine; In: *Peptides 2004* (Flegel, M., Fridkin, M., Gilon, C., Slaninova, J., eds.), Kenes International, Geneva, Switzerland.

ANHANG B: ABKÜRZUNGEN

Abb.	Abbildung
BCR	B cell receptor
BIT	Brain Ig-like molecule with tyrosine-based activation motifs
BLNK	B cell linker protein
BTLA	B and T lymphocyte attenuator
CD	Cluster of differentiation
c-kit	Csk homologous kinase
CSF	Colony stimulating factor
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4
EGF	Epidermal growth factor
Epo	Erythropoietin
ERK	Extracellular regulated kinase
FcR	Rezeptor, der Fc (fragment crystallizable) -Teil eines Antigens bindet
Grb2	Growth factor receptor-bound protein 2
He-PTP	hematopoietic protein tyrosine phosphatase
IC ₅₀	Konzentration, die eine 50%ige Hemmung auslöst
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ITAM	Immunoreceptor tyrosine based activation motif
ITIM	Immunoreceptor tyrosine based inhibition motif
Jak	Januskinase
JNK	C-jun N-terminal kinase
Lck	Lymphocyte kinase
LIR	Leukocyte immunoglobulin-like receptor
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
NF κ B	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells
NGF	Nerve growth factor
PDB	Proteindatenbank
PECAM	Platelet endothelial cell adhesion molecule
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PIR-B	Paired-Ig-like receptor B
PKC	Proteinkinase C
pNPP	p-Nitrophenylphosphat
PTK	Proteintyrosinkinase
PTP	Proteintyrosinphosphatase

Ras	von "rat sarcoma"
Ros	Onkogen des "aviral sarcoma virus UR2"
SH2	Src-Homologie Domäne 2
Shc	SH2 containing protein
SHP	Src Homologie Phosphatase
SLP-65	SH2-containing leukocyte protein of 65 kDa
Src	von ‚Sarkom-auslösend‘
STAT	Signal transducer and activator of transcription
Syk	Spleen tyrosine kinase
TCR	T cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor
Tyk	Tyrosine kinase
Yes	dem "Yamaguchi sarcoma virus" homologes Protein
ZAP-70	T cell zeta chain associated protein of 70 kDa

DANK

Mein besonderer Dank gilt PROF. DR. THORSTEN HEINZEL für die sehr guten Arbeitsbedingungen, die unablässige Förderung und Fürsprache während der vergangenen Jahre und sein stetes Interesse am Fortgang meiner Arbeiten.

Ich danke ebenfalls PROF. DR. FRANK D. BÖHMER für die langjährige Zusammenarbeit, die vielen hilfreichen Diskussionen und wertvollen Denkanstöße.

Bedanken möchte ich mich außerordentlich bei PROF. DR. MARTIN ZACHARIAS (Internationale Universität Bremen) für die langjährige Zusammenarbeit auf dem Gebiet der Molekülmodellierung von SH2-Domänen-Liganden.

Einen herzlichen Dank möchte ich an PROF. DR. DEHUA PEI (Ohio State University, Columbus) für die Möglichkeit, in seinem Labor arbeiten zu können, richten. Ich danke auch seinen ehemaligen Mitarbeiter(inne)n DR. ANNE-SOPHIE WAVREILLE, DR. MIKE C. SWEENEY, DR. JUNGUK PARK, DR. CHUANGUANG QIN und DR. YUN Ling, die mich während meines Aufenthaltes im Johnston Laboratory tatkräftig unterstützten.

In aller Dankbarkeit wende ich mich an Dr. KORNELIA HAMPEL, KATHLEEN TEICHMANN, DOREEN NOTHMANN, JACQUELINE WEISE, INA KAUFHOLD und NICOLE MARKSCHIES, die durch die im Rahmen ihrer Dissertationen bzw. Diplomarbeiten erzielten Ergebnisse wesentlich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

PROF. DR. S. REIßMANN danke ich für die langjährige Zusammenarbeit und Einführung in die Welt der Peptide. Ein großer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Instituts für Biochemie und Biophysik, insbesondere PROF. DR. CLAUS LIEBMANN, DR. SYLVIA MÜLLER und DR. GEORG GREINER, für das sehr angenehme und produktive Arbeitsklima.

PROF. DR. FRANK GROßE (FLI Jena) möchte ich für die Bereitstellung des Biacore 2000 Instruments herzlich danken.

Ich danke auch allen bisher nicht namentlich Erwähnten, die durch ihre positive Einflußnahme zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Meiner Familie danke ich für die Geduld und Anteilnahme, die sie mir in den vergangenen Jahren insbesondere bei Mißerfolgen entgegengebracht haben.

Für finanzielle Unterstützung danke ich der Deutschen Forschungsgemeinschaft (Projekt IM 97/2-1), dem Fonds der Chemischen Industrie, dem Thüringer Ministerium für Wissenschaft und Forschung, der Friedrich-Schiller-Universität Jena und der Ernst-Abbe-Stiftung.

LEBENS LAUF

Name: Dr. Diana Imhof, geb. Besser
 Geburtsdatum: 27. Oktober 1971
 Geburtsort: Zeulenroda
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstand: verheiratet, 1 Kind
 Schulausbildung: 1978-1988 Allgemeinbildende Oberschule Auma
 1988-1990 Erweiterte Oberschule Zeulenroda
 1990 Abitur
 Berufsausbildung: 1990-1994 Studium der Chemie, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 1994-1995 Studienaufenthalt, Dublin City University, Department of Science and Paramedical Studies, Dublin/Irland
 5/1996 Abschluß als Diplomchemiker, Friedrich-Schiller-Universität Jena, Thema der Diplomarbeit: „Synthese zyklischer Bradykinin-Analoga durch den Einbau von Peptoid-Strukturen und Dipeptidblöcken“
 Berufsweg: 6/1996-6/1999 Dissertation, Friedrich-Schiller-Universität Jena zum Thema: „Einsatz N-funktionalisierter Aminosäuren und Dipeptideinheiten zur Darstellung neuer Somatostatin-Analoga und zum Studium der Rückgratcyclisierung in Peptiden“
 7/1999-8/2000 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 9/2000-6/2001 Leiterin der Serviceeinheit Z4 des IZKF Leipzig
 7/2001-12/2001 Stipendiatin, HWP des Freistaates Thüringen, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 1/2002-7/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 8/2004 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, HWP des Freistaates Thüringen, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 9/2004-2/2005 Post-doc, Ohio State University Columbus/ USA
 3/2005-12/2006 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, HWP des Freistaates Thüringen, Friedrich-Schiller-Universität Jena
 1/2007-12/2007 Wissenschaftliche Mitarbeiterin, Friedrich-Schiller-Universität Jena

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre hiermit, dass mir die Habilitationsordnung der Friedrich-Schiller-Universität Jena vom April 1997 bekannt ist.

Ferner erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Bei der Auswahl und Auswertung folgenden Materials haben mir nachstehend aufgeführte Personen in der jeweils beschriebenen Weise entgeltlich/unentgeltlich geholfen: keine.

Weitere Personen waren an der inhaltlich-materiellen Erstellung der Arbeit nicht beteiligt. Insbesondere habe ich hierfür nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Arbeit stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ich versichere, dass ich nach bestem Wissen die reine Wahrheit gesagt und nichts verschwiegen habe.

Jena, den 16. Juli 2007

Unterschrift